

Université de Sherbrooke

**Développement de ribozymes *delta* contre l'unique ARNm  
du virus de l'hépatite *delta* humaine**

Par  
Mme Guylaine Roy  
Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

17 août 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-40622-9

## TABLE DES MATIERES

<u>LISTE DES FIGURES</u>	IV
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	VI
<u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u>	VII
<u>RÉSUMÉ</u>	
<u>1. INTRODUCTION</u>	3
1.1 VIRUS DE L'HÉPATITE <i>DELTA</i> HUMAINE	3
1.1.1 Caractéristiques du virus de l'hépatite <i>delta</i> humaine	4
1.1.2 Les antigènes <i>delta</i>	7
1.1.3 Les motifs autocatalytiques d'ARN du virus de l'hépatite <i>delta</i> humaine	8
1.2 LES RIBOZYMES	11
1.2.1 Les différents motifs d'ARN catalytiques	12
1.2.2 Mécanisme d'action des ribozymes	20
1.2.3 Les applications potentielles des ribozymes	22
1.2.4 Les obstacles à surmonter pour le développement de ribozymes fonctionnels	23
1.3 APERÇU ET PERTINENCE DE LA RECHERCHE	24
1.3.1 Identification des séquences cibles potentielles sur l'ARNm cible	25
1.3.2 Construction et caractérisation des ribozymes contre l'ARNm HDAG	26
1.4 LES OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	27
<u>2. RÉSULTATS</u>	28
2.1 ARTICLE: Engineering of <i>delta</i> ribozymes capable of cleaving the human hepatitis <i>delta</i> virus antigen mRNA in <i>trans</i>	28
Abstract	29
Introduction	30
Results	33
Discussion	50
Conclusion	55
Materials and methods	55
Acknowledgments	60
References	61

3. DISCUSSION	64
3.1 IDENTIFICATION DES SITES CIBLES: ÉTUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE	64
3.2 CARACTÉRISATION DES RIBOZYMES CONSTRUITS	67
3.2.1 Clivage de l'ARNm HDAG	67
3.2.2 Clivage de courts substrats d'ARN	68
3.3 LE RIBOZYME PARFAIT: SPÉCIFICITÉ ET <i>TURNOVER</i> MAXIMUMS	70
3.4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	73
4. REMERCIEMENTS	74
5. RÉFÉRENCES	75
6. ANNEXES	80
6.1 ARTICLE: Design of ribozymes to selectively cleave the human hepatitis <i>delta</i> virus mRNA	81
Abstract	82
Introduction	82
Results and discussion	83
Conclusion	84
Acknowledgments	84
References	84
6.2 ARTICLE DE SYNTHÈSE: Le motif autocatalytique d'ARN du virus <i>delta</i> de l'hépatite humaine	85
Résumé	86
Introduction	86
Arrangement et mode de fonction du ribozyme <i>delta</i> chez VHD	87
Éléments essentiels du ribozyme <i>delta</i>	89
Modélisation de la structure tridimensionnelle	91
Recherche et développement de l'application du ribozyme <i>delta</i>	91
Remerciements	93
6.3 LETTRES D'APPROBATION DES CO-AUTEURS	94



## LISTE DES FIGURES

### 1. INTRODUCTION

Figure 1. Représentation schématique du génome du virus de l'hépatite <i>delta</i> humaine	6
Figure 2. Représentation de la réplication en cercle roulant du VHD	9
Figure 3. Les motifs autocatalytiques du VHD	10
Figure 4. La RNase P et sa séquence guide externe	13
Figure 5. Le ribozyme <i>hammerhead</i>	15
Figure 6. Le ribozyme <i>hairpin</i>	17
Figure 7. Le ribozyme <i>delta</i>	19
Figure 8. Réaction de transestérification catalysée par certains ribozymes	21

### 2. RÉSULTATS

<u>2.1 ARTICLE:</u> Engineering of <i>delta</i> ribozymes capable of cleaving the human hepatitis <i>delta</i> virus antigen mRNA in <i>trans</i>	28
Figure 1. Sequence and predicted secondary structure of the <i>delta</i> ribozyme used.	32
Figure 2. HDAG mRNA computer-predicted secondary structure and nuclease probing.	37
Figure 3. HDAG mRNA probing with oligonucleotides.	40
Figure 4. Cleavage of HDAG mRNA by <i>delta</i> ribozymes.	44

### 6. ANNEXES

<u>6.1 ARTICLE:</u> Design of ribozymes to selectively cleave the human hepatitis <i>delta</i> virus mRNA	81
Figure 1. Schematic representation of the <i>delta</i> ribozyme and the minigene including a cassette for the modification of the substrate recognition domain	83

<b>6.2 ARTICLE DE SYNTHÈSE: Le motif autocatalytique d'ARN du virus <i>delta</i> de l'hépatite humaine</b>	<b>85</b>
Figure 1. Représentation schématique de la structure en tige du virus de l'hépatite <i>delta</i> (VHD)	87
Figure 2. Représentation du cycle de réplication en cercle roulant du VHD.	88
Figure 3. Représentation schématique des motifs autocatalytiques d'ARN du VHD (réactions en cis)	89
Figure 4. Représentations schématiques de la structure secondaire et d'un modèle de structure tridimensionnelle du ribozyme <i>delta</i> .	90
Figure 5. Représentation schématique de différents ribozymes ciblant des substrats d'ARN non-naturels.	92

## LISTE DES TABLEAUX

### 1. INTRODUCTION

Tableau I. Similitudes et différences entre les viroïdes et le VHD.	5
---	---

### 2. RÉSULTATS

<u>2.1. ARTICLE:</u> Engineering of <i>delta</i> ribozymes capable of cleaving the human hepatitis <i>delta</i> virus antigen mRNA in <i>trans</i>	28
--	----

Table 1. Summary of the HDAg mRNA structure probing for potential ribozyme target sites.	36
--	----

Table 2. Synthesized <i>delta</i> ribozymes.	43
--	----

Table 3. Single turnover kinetic parameters of the active ribozymes.	46
--	----

Table 4. Cleavage of small substrates.	49
--	----

### 3. DISCUSSION

Tableau II. Comparaison des séquences reconnues et de la contribution au nombre d'appariement de ces séquences de divers ribozymes.	72
---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	adénine
a.a.	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNt	acide ribonucléique de transfert
BB	bleu de bromophénol
C	cytidine
db	double brin d'ARN ou d'ADN
EDTA	éthylène diamine tétraacétate de sodium
G	guanine
H	nucléotide A, C ou U
HDAG	antigène du virus de l'hépatite <i>delta</i> humaine
kb	kilobase d'ADN ou d'ARN
kDa	kiloDalton
$k_{obs}$	constante de vitesse observée
$k_{cat}$	constante catalytique
$K_M$	constante de Michaelis-Menten
$K_M'$	constante de Michaelis-Menten apparente
MDR	<i>multiple drug resistance</i>
N	n'importe quel nucléotide (G,A,U ou C)
nt	nucléotide
ori	origine de migration
ORF	cadre de lecture ouvert ( <i>open reading frame</i> )
pb	paire de base d'ADN ou d'ARN
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
Pu	purine
Py	pyrimidine
RNase	ribonucléase
Rz	ribozyme
sb	simple brin d'ARN ou d'ADN
Tris	hydroxyméthyl-aminométhane
U	uracile
UV	ultraviolet
VHB	virus de l'hépatite B humaine
VHD	virus de l'hépatite <i>delta</i> humaine
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
$V_{max}$	vitesse maximale
XC	xylène cyanol

## RÉSUMÉ

### Développement de ribozymes *delta* contre l'unique ARNm du virus de l'hépatite *delta* humaine

Par Mme Guylaine Roy  
Département de Biochimie  
Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

17 août 1998

Le virus de l'hépatite *delta* humaine (VHD) est un petit virus d'ARN circulaire qui infecte plus de 15 millions d'individus à travers le monde. Ce virus code pour un seul ARN messager (ARNm) et celui-ci génère deux isoformes de l'antigène *delta* (HDag), des protéines essentielles au VHD. Ce virus contient deux motifs d'ARN autocatalytiques, nommés motifs *delta*, impliqués dans l'autoclivage en *cis* des multimères générés lors de la réplication en cercle roulant de l'ARN viral. Ceux-ci sont localisés respectivement sur son brin d'ARN génomique et antigénomique. L'ingénierie de ces motifs permet d'obtenir les ribozymes *delta*, soient des ARN qui catalysent le clivage successif, à un site spécifique, de plusieurs molécules de substrats en *trans*. Le ribozyme *delta* reconnaît son substrat d'ARN par appariement de paires de bases et la séquence reconnue est: une pyrimidine, suivie d'une guanosine et de six autres nucléotides (PyGN<sub>6</sub>). Il est théoriquement possible de modifier le domaine de reconnaissance du substrat du ribozyme *delta* afin d'inactiver n'importe quel substrat d'ARN portant le PyGN<sub>6</sub>. Le ribozyme *delta* et d'autres ribozymes, possèdent donc un potentiel thérapeutique énorme pour l'inactivation d'ARN indésirables tels que les ARN viraux ou oncogènes. L'objectif de ce projet de recherche est de développer des ribozymes *delta* qui inactivent l'ARNm du VHD et d'approfondir les connaissances sur la spécificité de reconnaissance du substrat par le ribozyme *delta*. Pour favoriser l'appariement du ribozyme, un pré-requis pour le clivage subséquent de son substrat, la séquence cible sur l'ARNm doit être située dans une région simple brin de la structure secondaire. Nous avons donc identifié et vérifié l'accessibilité (région simple brin ou double brin) de douze sites cibles potentiels en étudiant la structure secondaire de l'ARNm HDag à l'aide de diverses méthodes dont la prédiction de structure secondaire par ordinateur, des essais de susceptibilité aux ribonucléases (RNase), des essais de rétention sur gel ainsi que des essais de RNase H. Les connaissances acquises par ces études de structure ont permis de définir neuf séquences cibles pour la construction de ribozymes *delta* contre l'ARNm HDag. Les ribozymes construits ont été soumis à des essais de clivage *in vitro* afin d'évaluer leur habileté à inactiver l'ARNm HDag ainsi que des courts substrats synthétiques. Parmi les neuf ribozymes construits, trois clivent efficacement l'ARNm *in vitro*. Certaines caractérisations biochimiques des ribozymes ont été effectuées et plusieurs paramètres cinétiques ont été déterminés autant pour l'ARNm que pour les courts substrats. Ces derniers ont permis d'éclaircir certains éléments requis pour un clivage spécifique et efficace par le ribozyme *delta*. À notre connaissance, cette étude montre pour la première fois l'utilisation du ribozyme *delta* en *trans* contre un ARNm naturel et met en lumière de nouveaux éléments quant à la spécificité de clivage du ribozyme *delta*.

**Mots-clés:** Ribozyme, virus de l'hépatite *delta* humaine, structure de l'ARN, thérapie génique, spécificité de substrats

## 1. INTRODUCTION

Depuis de nombreuses décennies, les humains n'ont cessé d'être infectés par divers virus. Ces derniers se répliquent seulement en parasitant une cellule hôte. Au cours des derniers siècles, les infections virales ont fait de nombreuses victimes. Pour ne citer que ces exemples, le virus de la grippe espagnole décima 20 millions de personnes au sortir de la première guerre mondiale (en 1918-1919), alors que le virus de la variole décima 40 millions de personnes au siècle dernier (Chastel, 1996). Les virus tels ceux de la polyomyélite, du sida, de l'hépatite B, et de la fièvre Ébola, nous rappellent la vulnérabilité de l'espèce humaine et les limitations de la science moderne face à de telles infections. Les recherches en cours sur les divers virus ont pour principaux objectifs de prévenir, ou encore de guérir, les maladies causées par ces agents pathogènes.

### 1.1 VIRUS DE L'HÉPATITE *DELTA* HUMAINE

Le VHD est responsable de l'une des nombreuses formes d'hépatite virale chez l'humain (revue par Hadziyannis, 1997; Carreno et *al.*, 1994; Lai, 1995; Lazinski et Taylor, 1994). À travers le monde, plus de 15 millions d'individus sont porteurs du VHD et 300 millions d'individus sont porteurs du virus de l'hépatite B (VHB). Malheureusement, à ce jour, aucun vaccin ou traitement n'existe pour combattre le VHD, ce qui constitue un problème de santé publique important. La prévalence de ce virus est particulièrement élevée sur les continents sud-américain, africain et asiatique mais est plutôt faible en Amérique du Nord et en Europe (Lazinski et Taylor, 1994). Le VHD est principalement transmis par voie sanguine et sa prévalence est très élevée chez les hémophiles et les toxicomanes intraveineux (Lazinski et Taylor, 1994). Le VHD est hépatotropique, c.a.d. qu'il infecte seulement les hépatocytes. Lors de la découverte du VHD en 1977, on

remarqua que ce virus était détectable seulement chez des individus également infectés par le VHB (Rizetto et *al.*, 1977). Seule une co-infection (infection simultanée par le VHD et VHB) ou une sur-infection (infection par le VHD d'un porteur du VHB) peuvent être à l'origine de l'hépatite *delta* (Carreno et *al.*, 1994). Le lien étroit entre ces deux virus provient du fait que le VHD emprunte des antigènes de surface au VHB pour se propager. L'hépatite *delta* se caractérise principalement par une sévérité accrue des symptômes causés par le VHB. L'infection par le VHD peut provoquer une hépatite aïgue ou encore fulminante, et augmente considérablement les risques d'hépatocarcinome (Lazinski et Taylor, 1994).

Plusieurs variants de séquences du VHD ont été répertoriés. Jusqu'à présent, vingt-et-une (21) séquences complètes sont connues (Lafontaine et *al.*, 1997). Ces séquences sont classées en trois groupes selon leur homologie (Hadziyannis, 1997). Ces groupes correspondent aux différents génotypes du VHD, soient les génotypes I, II et III. La prévalence de ces génotypes varie d'un continent à l'autre. Par exemple, en Amérique du Nord, on retrouve principalement des virus de génotype I. La sévérité des symptômes associés à une infection par le VHD pourrait être directement reliée au génotype viral que l'on retrouve chez les patients. Il existe une corrélation assez importante entre le génotype et les symptômes, le génotype III étant le plus sévère (Hadziyannis, 1997).

#### 1.1.1 Caractéristiques du virus de l'hépatite *delta* humaine

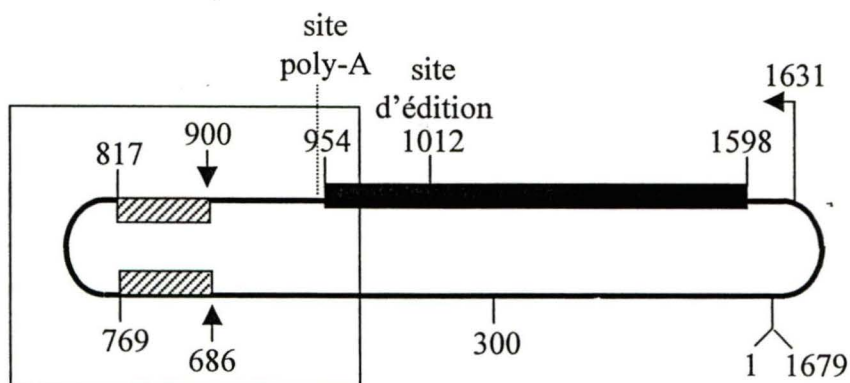
Le VHD est un virus très particulier parmi les virus animaux, certains le classifie comme une particule sous-virale, un virus défectif ou encore un virus satellite puisqu'il nécessite la présence d'un autre virus (le VHB) pour sa propagation (revue par Carreno et



*al.*, 1994; Hadziyannis, 1997; Lai, 1995; Lazinski et Taylor, 1994). Bien qu'aucune homologie de séquence puisse être déduite, le VHD possède plusieurs similarités avec certains viroïdes, de petits ARN qui infectent les plantes (Diener, 1993). Entre autres, le VHD possède un génome d'ARN circulaire et simple brin dont la taille atteint 1.7 kb. De nombreuses complémentarités, à l'intérieur de la séquence du génome viral, permettent au VHD d'adopter une structure secondaire sous forme d'une longue tige double brin (Figure 1). Tout comme les viroïdes, le VHD se réplique via un mécanisme de réplication en cercle roulant indépendant de l'ADN. Le VHD possède deux motifs d'ARN autocatalytiques, nommés motifs *delta*, nécessaires à cette réplication particulière, un sur le brin d'ARN génomique et l'autre sur le brin d'ARN antigénomique. Ces motifs sont impliqués dans l'auto-clivage en *cis* (sur la même molécule) des copies d'ARN multimériques générées lors de la réplication ce qui permet la libération des copies filles monomériques. Contrairement aux viroïdes, le VHD possède un cadre de lecture ouvert. Celui-ci code pour un seul ARNm qui peut cependant être traduit en deux isoformes de l'antigène *delta* (HDAg). Ces deux isoformes sont essentielles à la réplication et à l'encapsidation du génome viral. Le tableau I met en évidence les principales similitudes et différences entre les viroïdes et le VHD.

**TABLEAU I: Similitudes et différences entre certains viroïdes et le VHD.**

Caractéristiques	Viroïdes	VHD
Acide nucléique du génome	ARN simple brin	ARN simple brin
Taille du génome	246-475 nt	1679 nt
Forme du génome	Circulaire	Circulaire
Mécanisme de réplication	Cercle roulant	Cercle roulant
Structure en tige double brin	Oui	Oui
Hôte	Plantes	Humain
Code pour des protéines	Non	Oui



**Figure 1: Représentation schématique du génome du virus de l'hépatite *delta* humaine.** Le génome viral adopte une structure secondaire en forme de tige double brin. Le domaine possédant des caractéristiques retrouvées chez certains viroïdes est encadré. Les séquences des motifs autocatalytiques *delta* génomique et antigénomique sont représentées par des boîtes hachurées et leurs sites de clivage respectif est indiqué par une flèche aux positions 686 et 900. Le cadre de lecture ouvert encodant les deux isoformes de l'antigène *delta* est représenté par une boîte pleine et le site où se produit l'événement d'édition, générant les deux isoformes, est indiqué (position 1012). Le site d'initiation prédit de la transcription est indiqué par une flèche (position 1631). La numérotation correspond à celle de Makino et *al.*, 1987.

### 1.1.2 Les antigènes *delta*

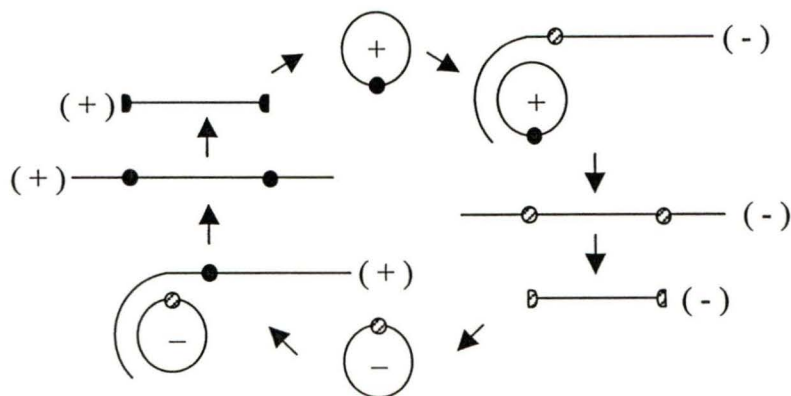
Le VHD code pour un seul ARNm d'environ 700 nt, celui-ci est polyadénylé et vraisemblablement produit par l'ARN polymérase II de l'hôte (Macnaughton et *al.*, 1991). Ce messenger code pour les deux isoformes de l'antigène *delta* (HDAg) (Lazinski et Taylor, 1994). La différence entre ces deux isoformes se retrouve dans la portion C-terminale. Un événement d'édition au niveau de l'ARNm transforme un codon d'arrêt en codon tryptophane, ce qui permet l'élongation du cadre de lecture ouvert de 19 acides aminés (a.a.) (Polson et *al.*, 1996). La forme originale permet de générer la courte isoforme (S-HDAg; 195 a.a.) tandis que l'événement d'édition conduit à l'isoforme longue de l'antigène *delta* (L-HDAg; 214 a.a.). Quoique très semblables au niveau de leur contenu en a.a., ces protéines ont des rôles biologiques très différents (revue par Lai, 1995). La S-HDAg est absolument requise pour la réplication du génome viral puisqu'elle favorise la réplication en cercle roulant. La L-HDAg réprime la réplication et stimule l'encapsidation du génome viral pour préparer la libération des virions. L'isoforme L-HDAg est celle qui interagit avec l'antigène de surface du VHB pour compléter l'enveloppe du VHD. Les deux isoformes possèdent un signal de localisation nucléaire, ce qui corrèle bien avec la localisation nucléaire de l'ARN génomique et antigénomique du VHD. Elles contiennent également deux motifs riches en arginine permettant la liaison à l'ARN. Les deux isoformes interagissent, sous forme d'homo- ou hétérodimères, pour lier l'ARN viral génomique, ce qui forme un complexe ribonucléoprotéique. Ceci permet de protéger l'ARN viral contre la dégradation par les ribonucléases (RNases) cellulaires. Ce complexe ribonucléoprotéique forme le coeur du virus qui se munie d'une enveloppe par bourgonnement à la surface cellulaire lors de la libération des virions (Poisson et *al.*, 1995).

### 1.1.3 Les motifs d'ARN catalytiques du virus de l'hépatite *delta* humaine

Le VHD se réplique via un mécanisme de cercle roulant complètement indépendant de l'ADN (Figure 2; revue par Lazinski et Taylor, 1995). Les ARN génomique et antigénomique servent donc de matrice à leur synthèse réciproque. Cette synthèse est effectuée dans le noyau par l'ARN polymérase II de l'hôte qui utilise l'ARN comme matrice plutôt que l'ADN (Macnaughton et *al.*, 1991). Ce mécanisme de réplication produit dans un premier temps, des copies d'ARN multimériques linéaires de polarité antigénomique à partir d'une copie d'ARN génomique circulaire (Figure 2). Ces multimères antigénomiques sont ensuite clivés en copies monomériques linéaires et recircularisées. Ces monomères antigénomiques circulaires servent alors de matrice pour la synthèse des copies multimériques linéaires de polarité génomique. Ces dernières sont à leur tour clivées en monomères et recircularisées afin d'entreprendre un nouveau cycle de réplication. La recircularisation des copies monomériques semble se faire au moyen d'une ligase de la cellule hôte (Lazinski et Taylor, 1995). La stratégie élaborée par le VHD, pour cliver les copies multimériques et libérer les copies filles monomériques linéaires, est l'utilisation de motifs d'ARN autocatalytiques. Ces motifs, nommés motifs *delta*, agissent en *cis*, c.a.d. qu'ils permettent l'autoclivage de leur propre brin d'ARN à un site spécifique (revue par Been et Wickham, 1997; Mercure et *al.*, 1997, article en annexe; Lazinski et Taylor, 1995).

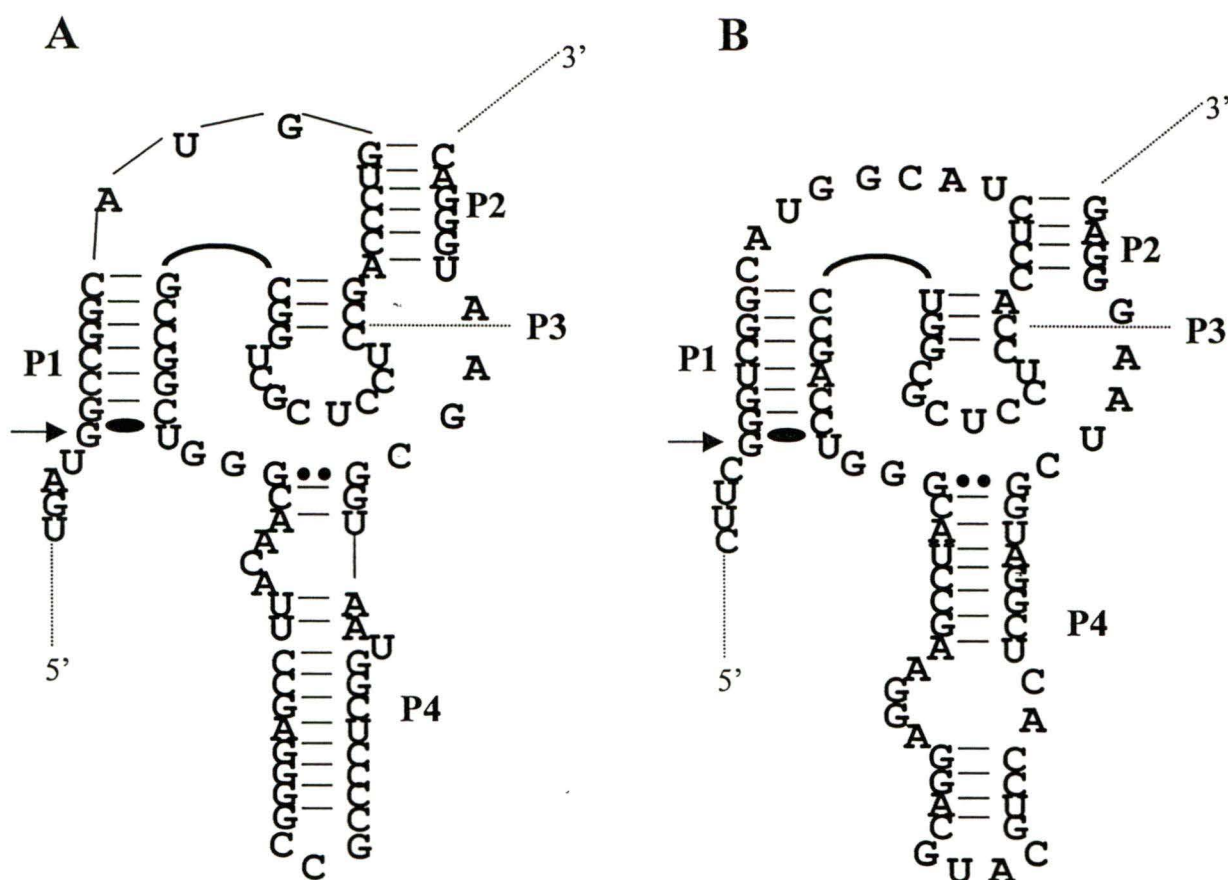
Les motifs autocatalytiques *delta* reconnaissent leur site de clivage spécifique par appariement de paires de bases et ce site se situe à des intervalles monomériques. Deux événements d'auto-clivage, sur une même molécule d'ARN, sont requis pour la libération d'une copie monomérique linéaire. Le VHD contient un motif *delta* sur son brin génomique

et un sur son brin antigénomique; chacun des motifs étant impliqués dans la libération de leur monomères de polarité respective. Les motifs *delta* génomique et antigénomique sont présentés à la figure 3. Ces motifs sont pratiquement identiques, dans leur polarité respective, puisqu'ils sont localisés dans une région relativement complémentaire du génome viral (Figure 1). L'adoption de la structure particulière de ces motifs autocatalytiques est nécessaire à leur activité et semble se former uniquement lors de la réplication. Cette structure n'est pas formée chez les copies filles recircularisées puisque celles-ci adoptent une structure fortement double brin. Plus de 70% du génome du VHD est apparié. Il est possible de modifier légèrement le motif autocatalytique *delta* afin de le séparer en deux entités: le centre catalytique et le substrat, pour obtenir un système de clivage en *trans*. Cette ingénierie donne naissance au ribozyme *delta* qui peut inactiver successivement plusieurs molécules de substrats en *trans* (discuté à la section 1.2.1; revue par Mercure et *al.*, 1997, article en annexe).



**Figure 2: Représentation du modèle de réplication en cercle roulant du VHD.** Les grands cercles schématisent l'ARN de polarité génomique (+) ou antigénomique (-) du VHD. Les petits cercles représentent les motifs autocatalytiques génomique (cercles pleins) et antigénomique (cercles hachurés) du VHD.





**Figure 3: Les motifs autocatalytiques du VHD.** Séquences nucléotidiques et structures secondaires selon le modèle en pseudo-noeud des motifs autocatalytiques A) génomique et B) antigénomique en *cis* du VHD. Les sites de clivage sont identifiés par une flèche. Les hélices double brin sont numérotées P1 à P4. Le reste de la séquence de l'ARN génomique ou antigénomique du VHD est représenté par des traits pointillés. L'appariement Wobble (G-U) et l'appariement homopurine (G-G) sont représentés respectivement par un oval et deux points. La numérotation et la séquence correspondent à celle de Makino et *al.*, 1987. Schéma inspiré de Mercure et *al.*, 1997 (article en annexe).

## 1.2 LES RIBOZYMES

Les ribozymes sont des molécules d'ARN qui possèdent une activité enzymatique d'où le terme ribozyme pour acide ribonucléique et enzyme. La découverte simultanée, par les laboratoires des Dr. Atlman et Cech, de molécules d'ARN ayant des activités catalytiques leur a valu le prix Nobel de chimie en 1989 (Guerrier-Takada et *al.*, 1983; Kruger et *al.*, 1982). Le groupe du Dr. Atlman remarqua que l'activité catalytique de la ribonucléase P (RNase P), un enzyme impliqué dans la maturation de l'extrémité 5' des ARN de transfert (ARNt), était en fait portée par la composante d'ARN de cette ribonucléoprotéine. Quant au Dr. Cech, il remarqua qu'un intron de groupe I d'un pré-ARN ribosomal de *Tetrahymena thermophila* était capable d'auto-épissage en absence de protéines. Par la suite, d'autres motifs d'ARN catalytiques ont été identifiés, confirmant l'habileté de l'ARN à catalyser des réactions chimiques, principalement sur des substrats d'ARN. La plupart des motifs d'ARN catalytiques connus reconnaissent leur substrat par appariement de paires de bases et médient le clivage de ce substrat à un site spécifique, ce qui résulte en la destruction du substrat. La spécificité de l'appariement de paires de bases Watson-Crick est garante de la spécificité d'action des ribozymes sur leur ARN cible. Ces découvertes ont des retombées importantes puisque les ribozymes actuels sont considérés comme des outils thérapeutiques prometteurs pour l'inactivation de divers ARN tels que les ARN viraux ou oncogènes. Lorsque le substrat est clivé sous l'action d'un ribozyme, ce dernier peut se dissocier des produits de clivage et répéter son cycle de liaison au substrat, clivage et dissociation. Les ribozymes offrent donc un avantage comparativement aux stratégies d'oligonucléotides antisens puisqu'une molécule de ribozyme peut inactiver plusieurs molécules de substrats (Kijima et *al.*, 1995).

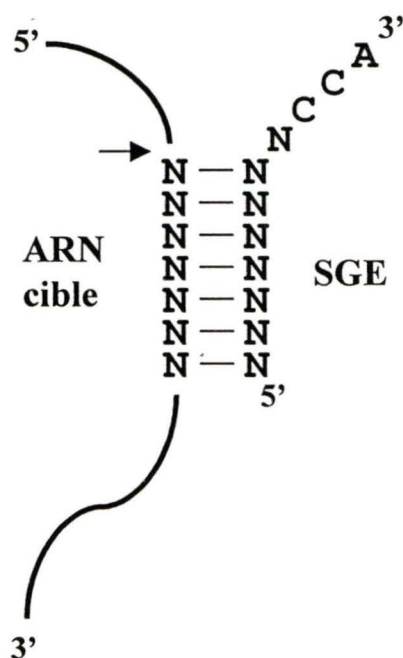
### 1.2.1 Les différents motifs d'ARN catalytiques

La plupart des motifs d'ARN catalytiques que l'on retrouve dans la nature agissent en *cis*, c.a.d. qu'ils catalysent une réaction intramoléculaire. Il est possible de dissocier divers domaines de ces motifs afin d'obtenir les ribozymes proprement dit, soient des molécules d'ARN capables de catalyser une réaction à plusieurs reprises en *trans*, c.a.d. intermoléculaire. Le développement de systèmes de coupure en *trans* (ou ribozymes) se fait généralement en séparant le motif initial d'ARN en deux molécules tout en respectant la structure secondaire catalytique minimale. Le scindage a donc pour but de libérer une molécule qui sera le substrat alors que le reste du motif sera le centre catalytique, soit le ribozyme proprement dit. Seuls les motifs catalytiques utilisés en tant que ribozymes (c.a.d. en *trans*) seront discutés ici (Figures 4 à 7).

La RNase P est un enzyme vital qui catalyse le clivage endonucléolytique de l'extrémité 5' des précurseurs d'ARNt (revue par Perreault et Altman, 1991). Cet enzyme ubiquitaire possède une sous-unité d'ARN et au moins une sous-unité protéique. La composante d'ARN possède l'activité catalytique. Contrairement aux autres motifs catalytiques naturels, la RNase P agit sur un substrat en *trans*, ce qui en fait le seul ribozyme naturel identifié à ce jour. Une seule RNase P assure la maturation des divers ARNt immatures d'une cellule, ce qui suggère que cet enzyme reconnaît une structure particulière et non une séquence spécifique. Cette structure a été identifiée comme étant une hélice en 5' flanquée d'une séquence guide externe en 3' (Figure 4). Cette séquence guide externe, NCCA (N pour A, C, G ou U), permet de cibler différents substrats. Pour inactiver un ARN avec la RNase P, il suffit de fournir à cet enzyme un ARN contenant la séquence



guide externe et une partie complémentaire à l'ARN cible pour former une hélice double brin. Cette hélice peut accommoder n'importe quel nucléotide ce qui rend le nombre de cibles potentielles illimité. Puisque la RNase P est une composante naturelle de tous les types cellulaires, son potentiel comme outil thérapeutique anti-ARN est largement étudié.



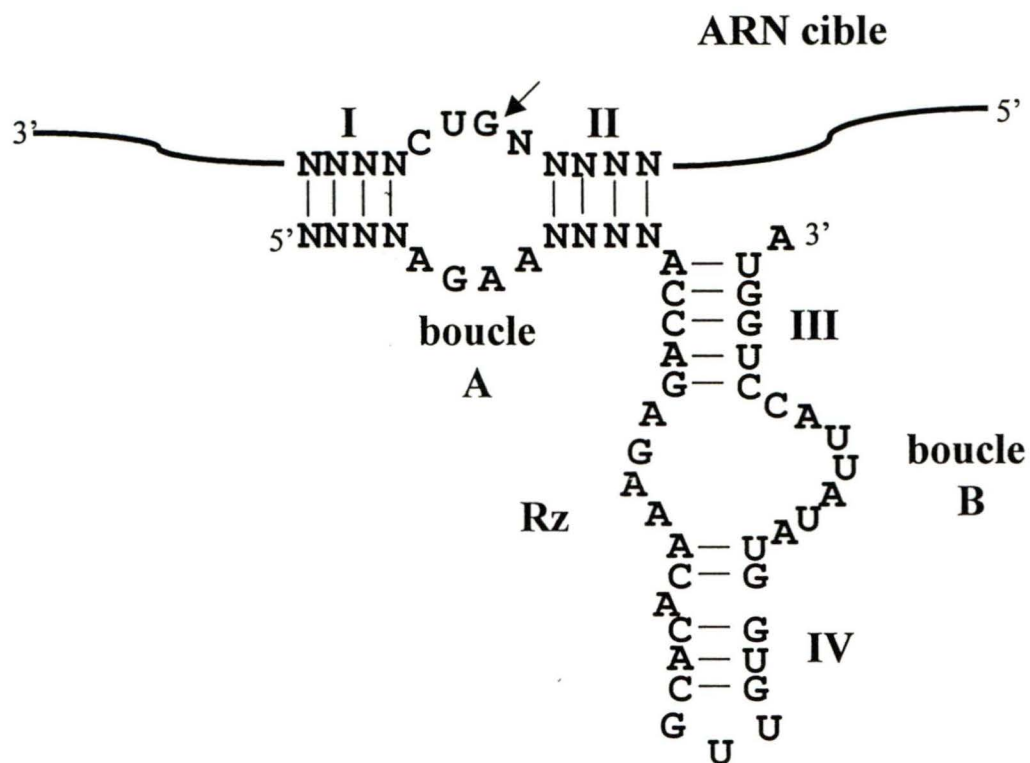
**Figure 4: La RNase P et sa séquence guide externe.** Représentation schématique d'une séquence guide externe (SGE) qui cible un ARN. La RNase P reconnaît ce complexe et induit le clivage de l'ARN cible à l'endroit indiqué par la flèche. N représente n'importe quel nucléotide (A, C, G ou U).

Le motif catalytique en tête de marteau, dit *hammerhead*, se retrouve chez certains viroïdes et virusoïdes, des petits ARN pathogènes de plantes (revue par Birikh et *al.*, 1997a). Ce motif catalyse naturellement le clivage en *cis* des molécules d'ARN de ces agents pathogènes lors de leur réplication en cercle roulant. Ce motif peut être séparé en deux parties afin d'obtenir un système en *trans* constitué d'un substrat, et d'un centre catalytique nommé ribozyme *hammerhead* (Figure 5). De tous les ribozymes connus, il est le plus étudié et son mécanisme de réaction est le mieux compris. Ce ribozyme d'environ 35 à 40 nt est constitué de trois hélices double brin, identifiées I, II et III. Le motif *hammerhead* (en *cis*) a été séparé de façon à ce que les hélices I et III se forment par appariement avec le substrat dans un système en *trans*. Les hélices sont reliées entre elles par des boucles simple brin. Les séquences des régions simple brin sont bien conservées à travers les divers motifs *hammerhead* retrouvés dans la nature (agissant en *cis*) alors que celles des hélices double brin I et III sont plutôt variables (Bartolomé et *al.*, 1995). Théoriquement, n'importe quelle séquence peut être représentée au niveau des hélices I et III, ce qui permet de construire des ribozymes *hammerhead* contre n'importe quel ARN cible. Cependant, au site de clivage du *hammerhead* se trouve un triplet NUH (N étant A, C, G, ou U et H étant C, A ou U) qui doit être porté par tout substrat éventuel. La coupure s'effectue après le H. L'adoption d'une structure particulière et la longueur des hélices jouent un rôle crucial pour obtenir une activité maximale du *hammerhead* (Birikh et *al.*, 1997a; Bartolomé et *al.*, 1995). Tous les éléments nécessaires au maintien de la structure active favorisent donc l'activité catalytique du ribozyme. En général, la longueur des hélices I et III est ajustée pour que le *hammerhead* inactive de façon optimale un substrat minimal d'environ 11 à 13 nt. Comme ce ribozyme a une très petite taille, il est facile à étudier et il reçoit beaucoup d'attention pour les thérapies anti-virales telles que celles contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).



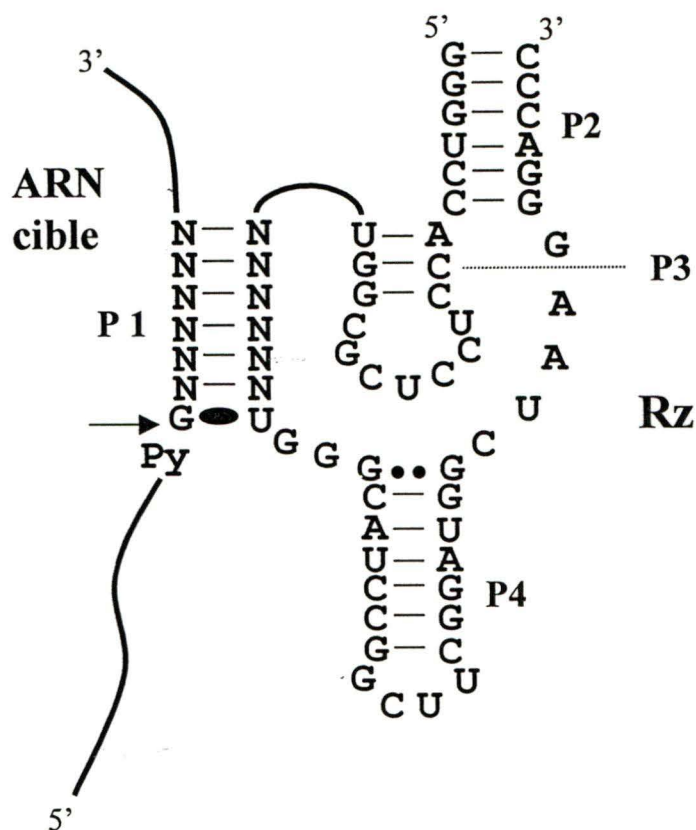
**Figure 5: Le ribozyme *hammerhead*.** Séquence nucléotidique et structure secondaire prédite du ribozyme *hammerhead* ciblant un ARN cible en *trans*. Le site de clivage est représenté par la flèche. Les hélices double brin sont numérotées de I à III. N signifie n'importe quel nucléotide (A, C, G ou U) alors que H représente un A, C ou U. Rz signifie ribozyme. Schéma inspiré de James et Gibson, 1998.

Le motif catalytique en épingle à cheveux, dit *hairpin*, se retrouve dans la nature chez des ARN satellites de virus de plantes qui rappellent les viroïdes. Le domaine structural de ce motif peut également être séparé en deux entités générant ainsi le ribozyme *hairpin* (domaine catalytique) et le substrat (revue par Kijima et *al.*, 1995). Ce ribozyme d'une cinquantaine de nucléotides peut cliver un substrat minimal de 14 nt (Figure 6). La structure proposée du *hairpin* apparié à son substrat est constituée de quatre domaines hélicaux séparés par deux domaines simple brin nommés boucle A et boucle B. Le substrat se lie au *hairpin* pour former les hélices I et II. Les séquences nucléotidiques de ces hélices ne semblent pas être importantes pour le maintien de l'activité catalytique du *hairpin*, ce qui constitue un avantage pour l'ingénierie de ribozymes *hairpin* contre divers ARN cibles. Afin d'être inactivé par le *hairpin*, le substrat doit porter une séquence CUG au site de clivage, le clivage s'effectuant en 3' de ce G. Contrairement aux séquences des hélices qui tolèrent une grande diversité, les séquences des boucles internes sont plutôt bien conservées. Celles-ci jouent vraisemblablement un rôle pour le maintien de l'activité catalytique du ribozyme. Tout comme le *hammerhead*, le *hairpin* est un ribozyme dont le potentiel fait l'objet de recherches orientées vers des applications thérapeutiques.



**Figure 6: Le ribozyme *hairpin*.** Séquence nucléotidique et structure secondaire prédite du ribozyme *hairpin* ciblant un ARN en *trans* et induisant son clivage à l'endroit indiqué par la flèche. Les hélices double brin sont numérotées de I à IV alors que les boucles simple brin sont nommées boucle A et boucle B. N est pour n'importe quel nucléotide (A, C, G ou U). Rz est pour ribozyme. Schéma inspiré de James et Gibson, 1998.

Le ribozyme *delta* est dérivé des motifs autocatalytiques *delta* que l'on retrouve sur les brins génomique et antigénomique du VHD (revue par Mercure et *al.*, 1997, article en annexe; Been et Wickham, 1997). L'ingénierie des motifs autocatalytiques du VHD permet d'obtenir un ribozyme *delta* capable d'effectuer le clivage successif de plusieurs molécules de substrats en *trans* (Figure 7). Le ribozyme *delta* utilisé dans notre étude, a une taille de 57 nt et nécessite un substrat minimal de 8 nt pour son activité catalytique. Le ribozyme *delta* est constitué de quatre hélices double brin nommées hélices P1 à P4 et celles-ci sont reliées entre elles par des régions simple brin. L'appariement du substrat au ribozyme forme l'hélice P1. Bien que les nucléotides nécessaires à l'activité de ce ribozyme soient encore peu connus, il semble que l'hélice P1 peut tolérer une grande diversité de séquences, ce qui permet la construction éventuelle de ribozymes *delta* contre divers ARN cibles. Un substrat potentiel du ribozyme *delta* doit porter une pyrimidine (préférentiellement) suivie d'un G au site de coupure et de six autres nucléotides (PyGN<sub>6</sub>), le clivage s'effectuant entre la pyrimidine et le G (Perrotta et Been, 1996). Bien que ce ribozyme soit très peu étudié, il possède des avantages marqués par rapport aux autres ribozymes. Contrairement au *hammerhead* et au *hairpin*, il est pleinement fonctionnel à des concentrations physiologiques d'ions calcium et magnésium (c.a.d. ~1 mM; Perrotta et Been, 1990). Enfin, il possède la capacité naturelle à fonctionner dans un contexte cellulaire humain de par son implication dans la libération des copies monomériques lors de la réplication en cercle roulant du VHD.

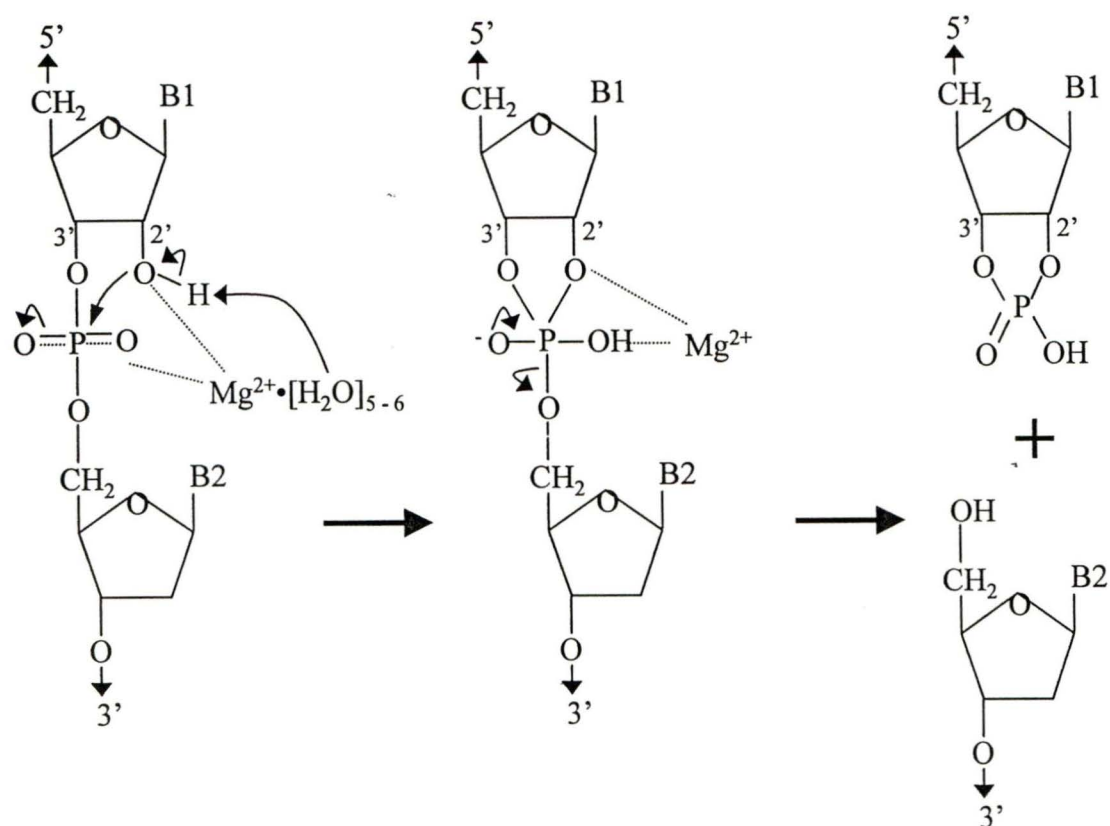


**Figure 7: Le ribozyme *delta*.** Séquence nucléotidique et structure secondaire prédite du ribozyme *delta* ciblant un ARN en *trans*. Le site de clivage est indiqué par une flèche. Les régions double brin sont numérotées de P1 à P4. L'appariement Wobble (G-U) et l'appariement homopurine (G-G) sont représentés respectivement par un oval et deux points. N est pour n'importe quel nucléotide (A, C, G ou U) et Py est pour une pyrimidine (C ou U). Schéma inspiré de Mercure et *al.*, 1997 (article en annexe).

### 1.2.2 Mécanisme d'action des ribozymes

Les ribozymes sont, en fait, des métalloenzymes puisqu'ils requièrent la présence d'ions cationiques bivalents pour leur activité (Ohkawa et *al.*, 1995). Bien que d'autres cations bivalents puissent être utilisés, l'ion magnésium est le plus souvent mis à contribution pour le maintien de l'activité catalytique des ribozymes. Ces ions sont directement impliqués dans la catalyse et jouent un rôle important dans le maintien d'une structure active des ribozymes. La réaction de clivage, décrite pour les ribozymes discutés ci-dessus à l'exception de la RNase P, est une réaction de transestérification (Perreault et *al.*, 1991; Steitz et Steitz, 1993; Ohkawa et *al.*, 1995; Birikh et *al.*, 1997a). En fait, le lien phosphodiester qui unit deux nucléotides est clivé par le ribozyme à l'aide d'un cation bivalent pour générer deux produits; l'un avec une extrémité 2'-3' phosphocyclique et l'autre avec une extrémité 5'-hydroxyle (Figure 8). Plus précisément, le groupement 2'-hydroxyle adjacent au site de clivage est déprotoné, ce qui génère un groupement 2'-alkoxide pouvant faire une attaque nucléophile sur la liaison phosphodiester rendue labile par la coordination du cation. Cette attaque forme un intermédiaire pentacoordiné instable. La stabilisation de cet intermédiaire par une seconde attaque nucléophile (voir figure 8) résulte en la formation d'une liaison 2'-3' phosphocyclique et libère une extrémité 5'-hydroxyle. La coupure d'un substrat par un ribozyme se fait à un endroit spécifique. Le choix de ce site est favorisé par l'adoption d'une structure particulière par le complexe substrat-ribozyme, ce qui crée un environnement favorable à la réaction. Pour que cette structure se forme, le substrat doit d'abord se lier au ribozyme par un appariement de paires de bases Watson-Crick. Cette spécificité d'appariement et de coupure dirigée, est à la base du développement des ribozymes comme outils thérapeutiques potentiels pour contrôler l'expression génétique.





**Figure 8: Réaction de transestérification catalysée par certains ribozymes.** Un ion de magnésium hydraté (schématisé  $Mg^{2+} \cdot [H_2O]_{5-6}$ ) aide à catalyser la réaction en soustrayant un proton au groupement 2'-hydroxyle d'un nucléotide et en établissant une liaison de coordination (traits pointillés) avec les oxygènes. Il s'ensuit une attaque nucléophile et libération de deux produits ayant respectivement une extrémité 5'-hydroxyle et 2'-3' phosphocyclique. B est pour n'importe quelle base azotée (A, C, G ou U).

### 1.2.3 Les applications potentielles des ribozymes

Puisqu'il est théoriquement possible de construire des ribozymes contre n'importe quel ARN, de le reconnaître spécifiquement par appariement de paires de bases et enfin de l'inactiver par clivage à un site spécifique, les ribozymes ont plusieurs applications potentielles (revue par James et Gibson, 1998). Entre autres, les ribozymes pourraient permettre de contrôler l'expression d'ARN indésirables tels que les ARN viraux ou oncogènes. L'utilisation thérapeutique de tels ribozymes pourraient avoir des retombées extrêmement considérables. L'application des ribozymes comme agents anti-viraux est principalement étudiée contre le VIH à l'aide des ribozymes *hammerhead* et *hairpin*. Un ribozyme *hairpin* (Woog-Staal et al., 1993) est présentement en phase I des essais cliniques contre le VIH. Ce ribozyme a été transfecté *ex vivo* dans des lymphocytes T (CD4<sup>+</sup>) de patients infectés par le VIH et un ralentissement notable de la réplication virale a été observé (Leavitt et al., 1996). Les ribozymes pourraient éventuellement servir d'outils thérapeutiques pour certaines formes de cancer. Par exemple, dans les cas où l'ARN exprimé par l'allèle oncogène diffère de l'ARN exprimé par l'allèle normale par une mutation ponctuelle, une délétion ou une insertion, il serait possible de cibler les ribozymes spécifiquement à cet endroit et ainsi d'inactiver que l'ARN oncogène. De nombreux oncogènes sont l'objet de ces stratégies dont *H-ras* et *BCR-ABL* (revue par James et Gibson, 1998). Le renversement des phénotypes de résistances à certaines drogues est aussi candidat pour l'application des ribozymes. En effet, les ribozymes peuvent être dirigés de façon à inactiver l'ARNm qui confère la résistance à certaines drogues (souvent le *MDR*; multiple drug resistance). La sensibilité à ces drogues peut ainsi être restaurée comme ce fût le cas, par exemple, pour la sensibilité retrouvée à la vincristine suite à l'utilisation de ribozymes contre le *MDR* (Kobayashi et al., 1994). En plus de leur potentiel comme outils

thérapeutiques, les ribozymes peuvent être utilisés comme outils moléculaires pour élucider la fonction de différents gènes. Les ribozymes peuvent ainsi servir pour créer des phénotypes de perte de fonction. Cette application a, entre autres, été utilisée pour l'étude du gène *Fushi taraga* de *Drosophila*, de *c-fos* et de la métalloprotéinase 2 de la matrice (James et Gibson, 1998). Enfin, les ribozymes pourraient jouer le rôle d'endonucléase site-spécifique pour l'ARN, ils seraient en quelque sorte l'équivalent des endonucléases de restriction pour l'ADN. La découverte de ces derniers, a fait grandement évoluer les connaissances en biologie moléculaire et les "ribozymes de restriction" auront sûrement des retombées toutes aussi importantes.

#### 1.2.4 Les obstacles à surmonter pour le développement de ribozymes fonctionnels

Afin que les ribozymes deviennent des outils thérapeutiques et moléculaires réalistes, plusieurs obstacles restent à surmonter (revue par James et Gibson, 1998). Il faut d'abord s'assurer que les séquences cibles sur l'ARN d'intérêt sont accessibles pour que le ribozyme puisse s'y appairer et induire le clivage spécifique. Ces séquences ne doivent pas être prisonnières d'une structure secondaire ou tertiaire forte (par exemple une région double brin), ni être liées par une protéine cellulaire ce qui pourrait avoir pour effet de masquer ces séquences. La stabilité des ribozymes, qui sont très sensibles à l'action des ribonucléases cellulaires, doit être augmentée. Pour ce faire, il est possible d'utiliser des nucléotides modifiés chimiquement lors de la synthèse des ribozymes. La spécificité du ribozyme à inactiver un seul ARN cible doit également être assurée. Puisque les ribozymes reconnaissent de courtes séquences nucléotidiques, il est possible que ces séquences se retrouvent chez d'autres ARN dont l'inactivation serait nocive. Pour augmenter la spécificité des ribozymes, l'extension du domaine de reconnaissance du substrat doit être

effectuée sans pour autant nuire à la catalyse de la réaction (Herschlag, 1991). De trop longues séquences de reconnaissance défavorisent la dissociation des produits du ribozyme, ce qui a pour conséquence de diminuer l'activité catalytique des ribozymes, c.a.d. le *turnover*. De plus, la colocalisation de l'ARN cible et du ribozyme à l'intérieur de la cellule doit être assurée. Des vecteurs d'expression et des séquences signales spécifiques doivent être développés et utilisés pour assurer la localisation du ribozyme au compartiment cellulaire approprié. Des moyens efficaces de livraison et d'expression des ribozymes dans les cellules cibles doivent être élaborés. Enfin, une meilleure compréhension des mécanismes de réaction et structures actives des ribozymes doit être atteinte afin de permettre l'augmentation de leur *turnover* ou capacité d'inactiver successivement plusieurs molécules de substrats.

### 1.3 APERÇU ET PERTINENCE DE LA RECHERCHE

Les infections virales causées par le VHD et le VHB constituent un problème de santé publique très important. Puisque le VHD se propage qu'en présence du VHB, la prévention de l'infection par le VHD peut s'effectuer par la vaccination contre le VHB. Cependant, à ce jour il n'existe aucun traitement pour venir en aide aux patients atteints de l'hépatite *delta* (et de l'hépatite B), d'où l'importance de la recherche dans ce domaine. Comme le VHD accentue les symptômes de l'hépatite B ainsi que le taux de morbidité, il est primordial de développer des outils qui permettront d'amoindrir ces maux. Le développement d'outils visant à inhiber la propagation du VHD est au coeur de notre projet de recherche.

Le projet de recherche exposé vise à développer des ribozymes *delta* pouvant reconnaître et inactiver l'unique ARNm du VHD, ce qui devrait théoriquement réprimer la réplication et la propagation virale. Nous avons choisi le ribozyme *delta* pour notre étude puisqu'il origine du VHD et qu'il est le seul ribozyme connu qui possède l'habileté naturelle à fonctionner dans un contexte cellulaire humain. Notre étude vise également à exploiter le potentiel thérapeutique du ribozyme *delta* en tant qu'outil pour l'inactivation d'un ARNm naturel, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été rapporté. Pour ce faire, nous devons résoudre deux problèmes spécifiques: l'identification des séquences cibles potentielles sur l'ARNm HDAG ainsi que la construction et caractérisation des ribozymes *delta* contre ces séquences cibles. Tout en procédant à la caractérisation des ribozymes, une attention particulière sera portée à la spécificité de ces derniers lors du clivage de courts substrats d'ARN.

### 1.3.1 Identification des séquences cibles potentielles sur l'ARN cible

Avant même de débiter la construction de ribozymes contre un ARN cible, il faut concentrer ses efforts sur l'identification des sites qui serviront de cibles sur cet ARN. Puisque le ribozyme reconnaît son substrat par appariement de paires de bases, il est préférable que son site-substrat soit localisé dans une région simple brin de l'ARN pour faciliter l'hybridation du ribozyme, un pré-requis pour le clivage de la cible. Lorsque la cible se localise dans une région simple brin cela évite une compétition entre un appariement de paires de bases intramoléculaire (région double brin de l'ARN) et intermoléculaire (entre le ribozyme et son substrat). L'ARN a une tendance naturelle à se replier sur lui-même et à adopter de fortes structures secondaires comportant de nombreuses régions double brin, d'où l'importance de s'attarder à l'étude de la structure

secondaire de l'ARN pour le développement de ribozymes (par exemple Birikh et *al.*, 1997b; Campbell et Cech, 1995; Kawasaki et *al.*, 1996). Afin d'éviter des résultats décevants, nous utilisons, contrairement à d'autres équipes, une combinaison de quatre méthodes d'études de la structure secondaire pour identifier quelles seraient les meilleures séquences cibles sur notre ARN d'intérêt, soit l'ARNm HDAG. La combinaison des résultats obtenus à l'aide de toutes ces méthodes nous semble garante de la construction de ribozymes fonctionnels. De plus, notre étude pourrait permettre de définir une procédure idéale à suivre pour le développement de ribozymes contre n'importe quel ARN cible.

### 1.3.2 Construction et caractérisation des ribozymes contre l'ARNm HDAG

Les ribozymes sont construits à l'aide d'un minigène cassette qui permet de modifier facilement le domaine de reconnaissance du substrat du ribozyme *delta* afin de reconnaître la séquence cible désirée (section 6.1). Lorsque les ribozymes sont construits, il est important de procéder à certaines caractérisations cinétiques pour s'assurer que les ribozymes sont actifs. Puisque les nucléotides essentiels à l'activité du ribozyme *delta* ne sont pas encore identifiés avec précision, il est important de vérifier que les modifications effectuées lors de la construction des ribozymes n'ont pas réduit significativement l'activité. Pour s'assurer de la fonctionnalité des ribozymes construits, des essais de clivage *in vitro* de l'ARNm HDAG et de courts substrats synthétiques sont effectués. Par de tels essais, il est également possible de trouver les paramètres cinétiques propres à chaque ribozyme et d'évaluer la spécificité et les préférences du ribozyme *delta* envers diverses séquences. L'activité des ribozymes développés contre l'ARNm HDAG sera vérifiée en culture cellulaire dans des études futures. De tels ribozymes pourraient éventuellement être utilisés comme outils thérapeutiques contre le VHD.

## 1.4 LES OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

L'objectif principal du projet de recherche proposé, est d'inhiber la réplication et la propagation du VHD. L'approche utilisée pour parvenir à ces fins, est le développement de ribozymes *delta* contre l'unique ARNm du VHD. Afin d'atteindre ce but ultime, la construction de ribozymes *delta* doit être effectuée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, nous allons procéder à l'identification de différentes séquences cibles potentielles sur l'ARNm de l'antigène *delta* (HDAg) en fonction de leur accessibilité dans la structure secondaire de l'ARNm. Diverses méthodes d'étude de la structure secondaire de l'ARN seront utilisées à cette fin telles que la prédiction de structure secondaire par ordinateur, des essais de susceptibilité aux ribonucléases (RNase), des essais de rétention sur gel à l'aide d'oligonucléotides complémentaires aux séquences cibles potentielles et des essais de RNase H. Suite à l'identification des sites cibles potentiels, nous procéderons à la construction des plasmides qui codent pour les ribozymes *delta* reconnaissant ces séquences. Le clonage de ces ribozymes complété, nous procéderons à différentes caractérisations biochimiques de l'activité de ces ribozymes *in vitro*. Plusieurs études cinétiques des ribozymes seront entreprises afin d'évaluer leur efficacité à cliver l'ARNm HDAg ainsi que des courts substrats d'ARN synthétiques. De plus, les ribozymes construits seront utilisés afin d'élucider davantage la spécificité du ribozyme *delta* pour diverses séquences.

## **2. RÉSULTATS**

### **2.2 ARTICLE: Engineering of *delta* ribozymes capable of cleaving the human hepatitis *delta* virus antigen mRNA in *trans***

Guylaine Roy and Jean-Pierre Perreault

Département de biochimie  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Qué, Canada, J1H 5N4

June 18<sup>th</sup>, 1998

Article soumis à la revue *RNA*



## ABSTRACT

In conjunction with our goal of developing a gene-inactivation system of HDV mRNA (HDAg) using the *delta* ribozyme, we report the first demonstration of the cleavage of a natural mRNA *in trans* by the *delta* ribozyme. We have characterized potential *delta* ribozyme cleavage sites within HDV mRNA (i.e. C/UGN<sub>6</sub>), using computer prediction of secondary structure, oligonucleotide binding shift assays and both nuclease and ribonuclease H hydrolysis. Ribozymes were synthesized based on these structural data, and then tested for their ability to cleave the mRNA. Of the nine ribozymes examined, three were able to specifically cleave the mRNA. All three active ribozymes gave consistent indications that they cleaved single-stranded regions based on secondary structure probing data. Kinetic characterization of the ability of ribozymes to cleave both the full-length mRNA and either wildtype or mutant small model substrate suggests: i. the mRNA-ribozyme complex slowly undergoes a conformational change detectable in the presence of small substrates; ii. the *delta* ribozyme displays turnovers, allowing several mRNA molecules to be successively cleaved by one ribozyme molecule; and, iii. the substrate specificity of *delta* ribozyme cleavage is not restricted to C/UGN<sub>6</sub>. Specifically, substrates with a higher guanosine residue content upstream of the cleavage site (i.e. positions -4 to -2) were always cleaved more efficiently than the wildtype substrate.

**Keywords:** catalytic RNA; RNA structure; gene therapy; viral hepatitis

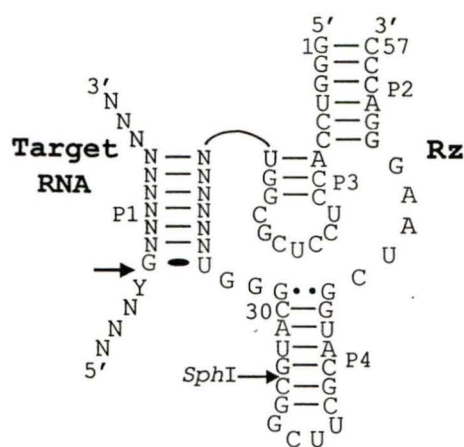
## INTRODUCTION

Human hepatitis *delta* virus (HDV) is an important public health problem with at least 15 million carriers worldwide. HDV is a subviral particle that propagates exclusively in the presence of the hepatitis B virus (HBV) from which it borrows envelop proteins (for reviews see Lai, 1995; Hadziyannis, 1997). HDV is a small, circular, single-stranded RNA genome (1,7 kb) that replicates through a DNA-independent rolling circle mechanism. This RNA genome produces a unique mRNA (~0.7 kb) that encodes the two isoforms of the *delta* antigen (HDAg), the small-HDAg (S-HDAg; 195 amino acids (a.a.)) and the large-HDAg (L-HDAg; 214 a.a.). These two isoforms differ by 19 a.a. in the C-terminal region as a result of an edition event in the mRNA which changes a stop codon into a tryptophan codon, therefore extending the open reading frame. Both isoforms have crucial roles in the HDV life cycle: S-HDAg is involved in HDV replication, while L-HDAg is required for viral packaging. Consequently, depletion of HDAg mRNA is an ideal means of controlling HDV propagation.

HDV, like some viroids and plant viroid-like satellite RNAs, possesses self-catalytic RNA sequences in both its genomic and antigenomic strands. These motifs cleave (in *cis*; intramolecular self-cleavage) into monomers the RNA multimeric strands produced during HDV replication (Lai, 1995). Minimal *delta* self-cleavage RNA strands of both polarities can be separated into two molecules in order to develop *trans* systems (intermolecular interactions between the ribozyme and its substrate) which include a *delta* ribozyme moiety that catalyzes successive cleavage of several molecules of substrate (for reviews see Been & Wickham, 1997; Mercure et al., 1997). *Delta* ribozyme is unique in its natural ability to function in human cells. The ability of ribozymes (*trans* systems) to specifically recognize

a substrate, and subsequently catalyze their cleavage, makes them attractive therapeutic tools for the inactivation of both viral RNA and mRNA associated with human diseases. *Delta* self-catalytic RNA strands have been shown to be useful for the self-cleavage in cells required to release a hammerhead ribozyme which subsequently acted in *trans* on a herpes simplex virus mRNA, as well as for the synthesis of RNAs with precise termini required in the production of defective interfering particles of vesicular stomatitis virus (Pattnaik et al., 1992; Chowrira et al., 1994). However, the use of *delta* ribozyme to cleave a natural mRNA in *trans* has not yet been reported. According to the pseudoknot model's secondary structure proposed for the *delta* ribozyme, substrate recognition (i.e. specificity) is based on the formation of the P1 stem which includes one G-U wobble basepair followed by six non-specific Watson-Crick basepairs (Fig. 1; Been & Wickham, 1997). Since it has been shown that a pyrimidine (Py) immediately adjacent to the cleavage site is preferable (Perrotta & Been, 1996), the logical design of a *delta* ribozyme against any RNA substrate is one containing the stretch PyGN<sub>6</sub> as its recognition sequence.

The goal of the present work is to investigate the potential of the *delta* ribozyme in the *trans* cleavage of an mRNA, specifically the HDAG mRNA. We report the identification of potential cleavage sites for *delta* ribozyme on the HDAG mRNA by secondary structure probing, the production of appropriate ribozymes and their characterization with respect to their ability to cleave both HDAG mRNA and minimal model substrates. The results show that *delta* ribozyme constitutes a potential catalytic RNA for further gene-inactivation therapy.



**FIGURE 1: Sequence and predicted secondary structure of the *delta* ribozyme.** The illustrated secondary structure is predicted by the pseudoknot model which includes four stems (P1 to P4; Perrotta & Been, 1991). The minimal P1 stem requirements for both the ribozyme and substrate strands are shown; Y and N represent a pyrimidine and any nucleotide (G,A,U,C), respectively. In the target RNA substrate the arrow points to the cleavage site. In the ribozyme (Rz), the homopurine basepair at the top of the P4 stem is represented by two dots (G•G), while the arrow indicates the *Sph* I restriction site used for modification of the ribozyme binding sequence.

## RESULTS

### Selection of potential target sequences in HDAg mRNA

We aligned all complete HDV variants and partial HDAg mRNA sequences reported to January 1, 1997 (17 complete and 35 partial sequences; Lafontaine et al., 1997) using the ClustalW package (version 1.6; Thompson et al., 1994). In the present study, the potential *delta* ribozyme target sequences in HDAg mRNA were selected according to these two criteria: i. these sequences should be perfectly conserved in more than 80% of the HDV variants and, ii. the conserved sequences should harbor the consensus recognition sequence of a *delta* ribozyme (i.e. PyGN<sub>6</sub>). Ten potential target sites were found within the HDAg mRNA (numbered 1 to 10; see Table 1 and Fig. 2).

### Probing the secondary structure of HDAg mRNA

*Delta* ribozyme target sequences located in single-stranded regions of HDAg mRNA have a higher potential as target sites because they should be more accessible to ribozyme attack than those found in double-stranded regions. Within the double-stranded regions, the ribozyme competes unfavorably with intramolecular base-pairing in order to bind its substrate (Campbell & Cech, 1995; Birikh et al., 1997), consequently we investigated the accessibility of the selected sites using several methods.

Initially, we used the Mfold package (version 2.3; Zuker, 1989) to predict the HDAg mRNA secondary structure. The ten most stable secondary structures in terms of minimal energy were generated for the 17 complete mRNA sequences. Figure 2A shows the most stable secondary structure obtained for the HDAg mRNA used in this study. This

RNA species, which is synthesized by *in vitro* transcription from the pKSAgS plasmid (see Materials and Methods), included the mRNA sequence plus 5'-end sequences from the vector (positions -83 to -52). However, the additional sequences did not significantly alter the predicted secondary structure as compared to the HDV sequence alone (data not shown). The 10 most stable structures of this sequence variant (an HDV genotype I) differed by only 2% in terms of free energy ( $-235$  to  $-230$  kcal·mol<sup>-1</sup>). The situation was similar for each variant, with only minor structural differences being observed between the most stable predictions for a particular variant. We observed three families of secondary structures that correlated with the HDV genotypes (i.e. genotypes I-III). An energy difference of only 10% was observed between the most stable predictions for each variant, and many structural similarities were conserved between the variants of a same genotype (data not shown). Considering all 170 compiled structures, each selected site was scored according to the likelihood of each nucleotide folding into either a single- or a double-stranded region. Selected sites were evaluated as being either highly single-stranded (++), or as having a preference for being single- (+) or double-stranded (-) according to whether more than 6, 4 or less nucleotides, respectively, were found in single-stranded regions (Table 1). According to this criteria, two sequences were highly single-stranded (sites 3 and 4), six were in regions with a preference for being single-stranded (sites 1, 2, 5, 6, 8) and three were in double-stranded (sites 7, 9, 10) regions.

In order to evaluate the accessibility of the sites, a ribonuclease probing of the HDV mRNA was performed (Fig. 2). The mRNA was either 5'- or 3'-end labelled, gel-purified, and partially hydrolyzed with either the single-stranded ribonuclease T1 (which cleaves 3' of G), or the double-stranded ribonuclease V1 (which cleaves 3' of double-stranded nucleotides regardless of base identity (A, C, G or U)). An example of an

autoradiogram showing the probing of nucleotides 617 to 678 of HDVg mRNA is shown in figure 2, panel B, while the complete results are summarized in panel A of this figure. Both the 5' and 3' terminal 200 nt and 250 nt, respectively, were probed by the nucleases, while the central region (~350 nt, contains sites 2, 3 and 4) could not be resolved by gel electrophoresis. Consequently, seven out of ten selected sites were analyzed (Fig. 2 and Table 1). Sites 1 and 8 had a preference for being single-stranded, while sites 5, 6, 7, 9 and 10 seemed to be primarily double-stranded. However, some positions were hydrolyzed by both single- and double-stranded ribonucleases suggesting that these nucleotides exist in both forms. The ribonucleases probing results are not strictly in agreement with the computer predicted structure (Figure 2A). On the basis of these considerations, one can only speculate on the folding of the mRNA molecule. Thus, only two of the selected sites appeared to be relatively accessible to ribozyme attack. Results from partial hydrolysis using the single-stranded specific ribonuclease U2 (which cleaves 3' of A) support these observations (data not shown). In order to maximize our chances of developing efficient ribozymes, we selected two additional sites which were observed to be highly accessible (numbered 11 and 12; see Table 1) according to nuclease probing assays. These two sites harbor the consensus recognition sequence (e.g. PyGN<sub>6</sub>), but were conserved between the HDV sequence variants at slightly less than 80% and therefore were not included in the initial list.

**TABLE 1.** Summary of the HDAG mRNA structure probing for potential ribozyme target sites.<sup>a</sup>

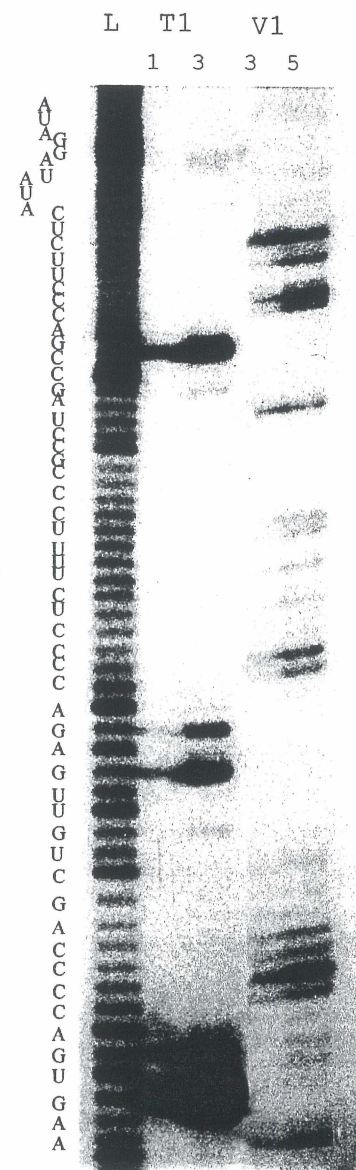
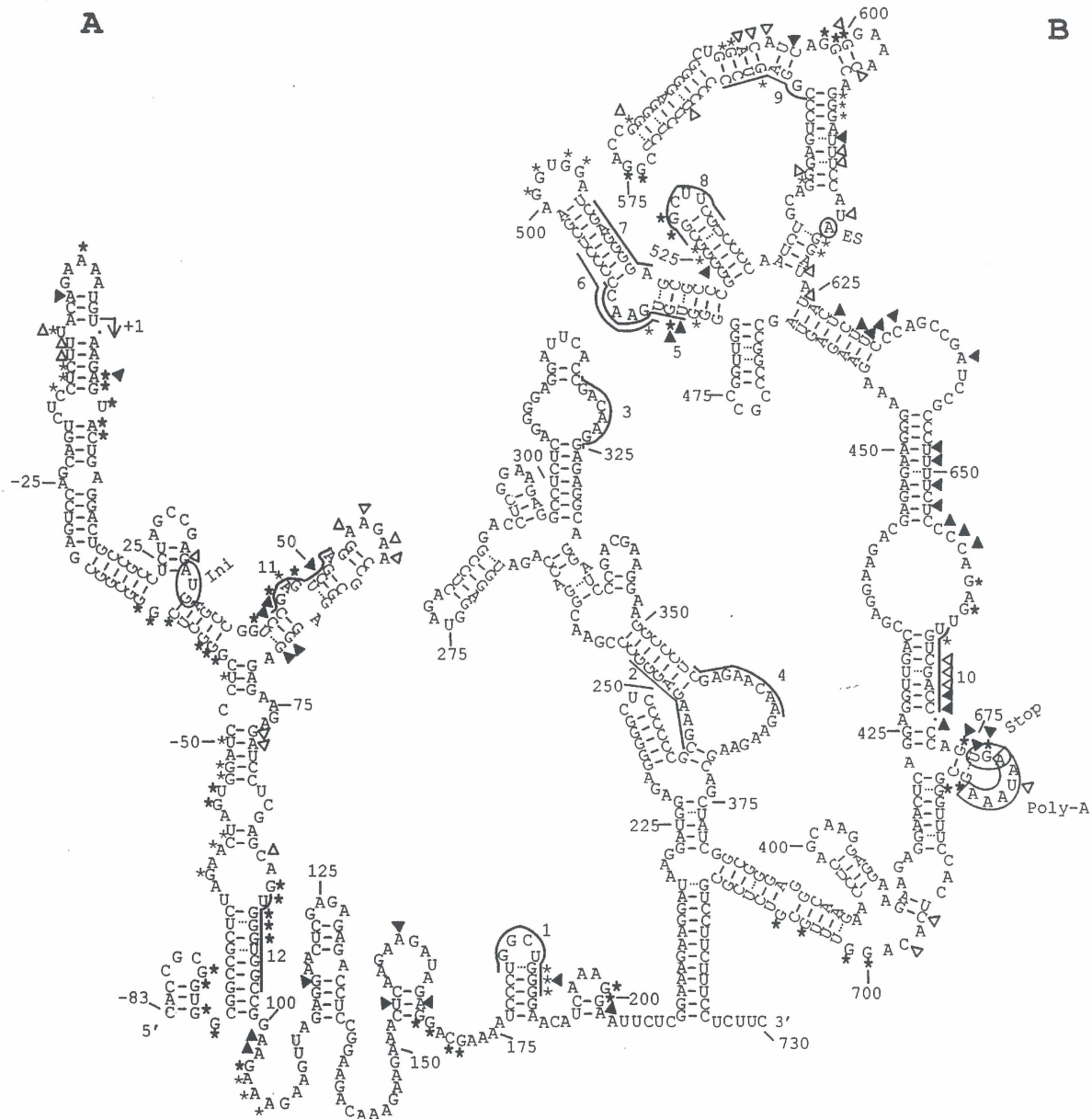
Site	Position in the mRNA <sup>b</sup>	mRNA sequence	Computer secondary structure	RNase susceptibility assays	Binding shift assays (K <sub>d</sub> in nM)	RNase H assays
1	181-188	UGGCUGGG	+	+	++ (69)	+
2	245-253	CGAAGAGG	+	n.d.	-	+
3	318-325	CGACAAGG	++	n.d.	-	+
4	356-365	CGAGAACA	++	n.d.	+	+
5	485-492	UGUGAACC	+	-	(663)	+
6	487-494	UGAACCCC	+	-	-	-
7	508-515	CGAGGGGA	-	-	++ (62)	+ <sup>c</sup>
8	527-534	CGGCUUCG	+	+	-	-
9	556-563	CGGAGUCC	-	-	++ (92)	+
10	663-670	UGUCGACC	-	-	-	-
11	45-52	CGAGUCGA	-	++	++ (59)	+
12	90-97	UGGGUGGC	+	++	++ (49)	+

<sup>a</sup> One or two plus signs (+) indicate a site that is mostly single-stranded (>4 and >6 single-stranded bases, respectively) by computer prediction, sensitive or highly sensitive to single-stranded ribonuclease, or efficiently bound an oligonucleotide according to gel retardation and RNase H assays. The minus sign (-) indicates that a site seems to be either double-stranded, or could not be probed. K<sub>d</sub>: dissociation constant; n.d.: not determined.

<sup>b</sup> Positions and sequences refer to the mRNA described in figure 2A.

<sup>c</sup> non-specific cleavage products were observed.





**FIGURE 2: HDAG mRNA computer-predicted secondary structure and nuclease probing.**

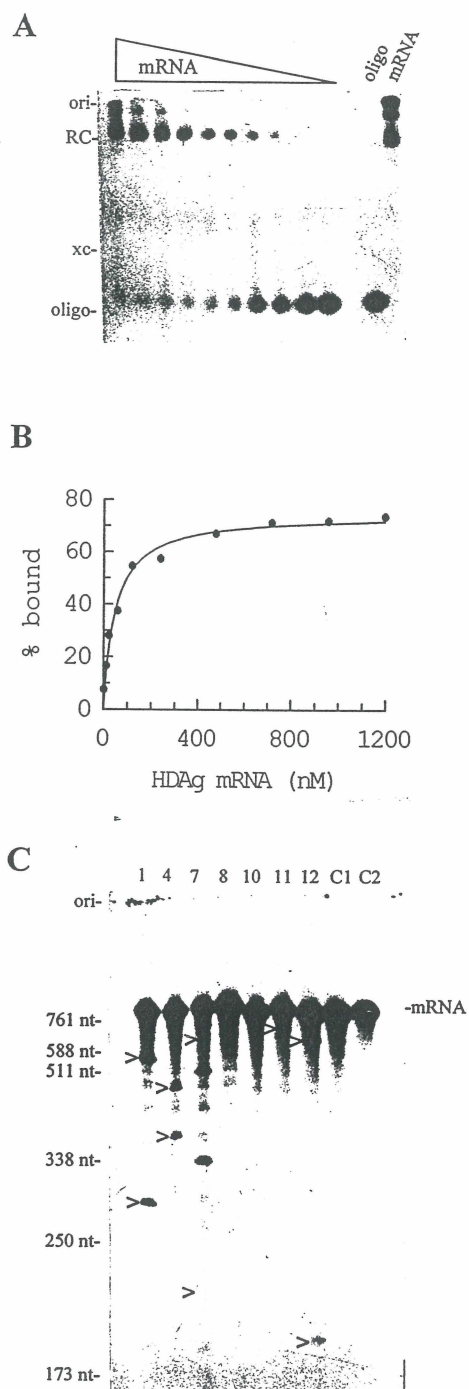
**A)** Predicted secondary structure of the HDAG mRNA used in this work. The natural transcription initiation site (+1), translation initiation codon (Ini), edition site (ES), stop codon (stop), poly-A signal (poly-A) and twelve potential ribozyme target sites (sequences underlined and numbered 1 to 12) are indicated. Nucleotides -83 to -52 correspond to pBluescript KS+ sequence, and nucleotides -51 to -1 are derived from cloning of the HDV sequence. The probing results of ribonucleases T1 and V1 are represented by stars (\* and ★) and triangles (Δ and ▲), respectively. The degree of darkness of each symbol corresponds to its relative susceptibility to be hydrolyzed by ribonuclease (pale and dark are for low and high susceptibility to hydrolysis, respectively).

**B)** Example of a nuclease probing autoradiogram for nucleotides 617 to 678 of the 3' end labelled HDAG mRNA. The first lane represents the mRNA alkaline hydrolysis size ladder (L). The second and the third lanes refer to RNase T1 hydrolysis whereas the fourth and the fifth lanes refer to RNase V1 hydrolysis. Numbers indicate the incubation times (in min) with each ribonuclease. See Materials and Methods for further details. On the left of the gel the corresponding mRNA sequence is shown.

In order to specifically probe all sites, we performed both mobility shift assays and ribonuclease H (RNase H) hydrolysis using 8-mer oligonucleotides of sequence corresponding to the recognition domain of the ribozyme (i.e. N<sub>6</sub>TG). We assumed that the hybridization of an oligonucleotide to the mRNA is an indication of the accessibility of the site. In the binding shift assay, the oligonucleotides were 5'-end labelled, preincubated with unlabelled HDAG mRNA and the mixtures were subsequently fractionated on native gels (Fig. 3A). Both the free and bound oligonucleotide fractions were quantified using a PhosphorImager (Molecular Dynamic), equilibrium dissociation constants ( $K_d$ ) were then estimated by constructing binding curves for each oligonucleotide (see Fig. 3B for an example, and Table 1 for the compiled results). Six oligonucleotides (sites 2, 3, 5, 6, 8 and 10) did not result in a band shift upon hybridization, even with an mRNA concentration of 1,2  $\mu$ M, suggesting that these sites are relatively inaccessible. In contrast, five oligonucleotides had a relatively high affinity for the mRNA (sites 1, 7, 9, 11, 12;  $K_d \sim 60$  nM), and one had a moderate affinity (site 4;  $K_d$  of 663 nM).

Ribonuclease H (RNase H), which specifically cleaves the RNA of a DNA-RNA duplex, can be used to verify whether or not the oligonucleotide binding is specific to a target sequence. Randomly labelled mRNA was preincubated with unlabelled oligonucleotides, hydrolyzed by RNase H, and the mixtures resolved on denaturing gels (see Fig. 3C for an example, and Table 1 for the compiled results). The presence of the oligonucleotides corresponding to sites 6, 8 and 10 did not produce RNase H hydrolysis products, confirming the inaccessibility of these three sites. In the presence of oligonucleotides corresponding to sites 1, 2, 3, 4, 5, 9, 11 and 12, products of appropriate size were observed. In contrast, the oligonucleotide corresponding to site 7 gave several non-specific products suggesting that it hybridize the mRNA at more than one position

(Fig. 3C). This result may be explained by the fact that *E. coli* RNase H requires only 4 basepairs of heteroduplex for its activity (Hogrefe et al., 1990). Thus, with the exception of site 7, the RNase H results confirm the specificity of the binding shift assays.



**FIGURE 3: HDAG mRNA probing with oligonucleotides.**

**A)** Autoradiogram of a gel shift assay for site 1. 5'-end labelled DNA oligonucleotide was incubated with mRNA concentrations ranging from 1200 nM to 2.4 nM, prior to fractionation on a native gel. Lanes labelled oligo and mRNA are the 5'-end labelled oligonucleotide alone and the randomly labelled mRNA alone, respectively. The position of migration of the retarded complex (RC), oligonucleotide (oligo), xylene cyanol (xc) and the origin (ori) are indicated. **B)** Plot of the bound oligonucleotide corresponding to site 1 as a function of the HDAG mRNA concentration. **C)** Autoradiogram of an RNase H assay for various sites. The number at the top of a lane indicates the number of the site probed, with the exceptions of C1 and C2 which indicate that the mRNA was incubated either in the presence or the absence of RNase H, respectively. On the left of the gel the positions of the RNA molecular weight markers are indicated (nt).

Discrepancies between the results from the different methods are apparent; for example, site 8 appeared in single-stranded region according to the computer prediction and ribonucleases mapping experiments, but both the binding shift and RNase H assays suggest that it is inaccessible to an oligonucleotide (see Table 1). According to all biochemical approaches sites 1, 11 and 12 seem to be highly accessible, and therefore, possess the highest potential as target sites for ribozyme-mediated cleavage of the HDAG mRNA.

### **Ribozyme cleavage of the HDAG mRNA**

The *delta* ribozyme used in this work was previously characterized for its ability to cleave small model substrates (Fig. 1; Ananvoranich & Perreault, 1998). This ribozyme is synthesized by *in vitro* transcription from a T7 RNA promoter immediately followed by a minigene cloned into pUC19 vector. The minigene was designed so as to have unique *Sal* I and *Sph* I restriction sites which allow modification of the recognition domain of the ribozyme (i.e. the 7 nucleotides of the P1 stem; Roy et al., 1997). Specifically, the *Sal* I site is located slightly upstream of the T7 RNA promoter, while the *Sph* I site is located in the P4 stem of the ribozyme (see Fig. 1). Therefore, the DNA insert between these two restriction sites constitutes an exchangeable cassette for construction of the nine clones encoding ribozymes with sequences required to recognize the selected sites (Table 2). The selection of the target sites was performed according to the structural data: sites 1, 11 and 12 appeared to be accessible by all structure probing biochemical methods, while sites 2, 3, 4, 7, 8 and 9 appeared to be accessible by at least two biochemical approaches (see Table 1). Therefore, we constructed plasmids encoding selected ribozyme sequences for all of these sites with the exception of site 8 for which neither mobility shift assay nor RNase H hydrolysis indicated a single-stranded region. Among the relatively inaccessible sites (i.e.

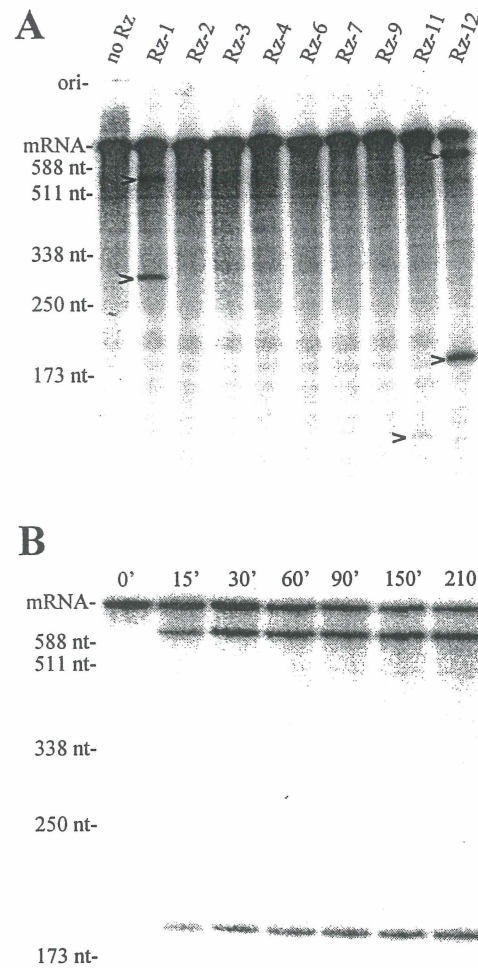
sites 5, 6 and 10), only site 6 was considered (as a negative control).

The ability of each ribozyme to cleave the labelled HDAG mRNA was tested under pre-steady-state conditions ( $[Rz] > [S]$ ) in which a 250 fold excess of ribozyme was individually mixed with random-labelled HDAG mRNA, preincubated at 37°C, and the reaction initiated by the addition of  $MgCl_2$  to a final concentration of 10 mM. After 3 hours of incubation at 37°C, the reactions were ended and analyzed on polyacrylamide gels (Fig. 4A). Among the nine ribozyme constructs, the cleavage products were detected only in the assays catalyzed by Rz-1, -11 and -12. Even then Rz-11 required an over-exposure of the gel in order to confirm the presence of the cleavage products. The sizes of the products obtained by the three active ribozymes correspond to those expected for their predicted cleavage sites (Table 2). In order to enhance the ribozyme-substrate binding, heat-denaturation (65°C for 2 min), followed to snap-cooling on ice (2 min), were performed prior preincubation at 37°C (data not shown). Under these conditions, as well as in the presence of a crude cytoplasmic protein extract from Hep-G2 cells, again only Rz-1, -11 and -12 exhibit catalytic activity (data not shown). These results indicate that the six other ribozymes (Rz-2, -3, -4, -6, -7 and -9) were inactive due to their inefficiencies to bind the HDAG mRNA, or to cleave the mRNA subsequently to formation of the ribozyme-substrate complex (see below).

**TABLE 2.** Synthesized *delta* ribozymes.<sup>a</sup>

Ribozyme	P1 stem sequence	Expected size of leavage products (nt)
Rz-1	CCCAGCU	265, 551
Rz-2	CCUCUUU	330, 486
Rz-3	CCUUGUU	403, 413
Rz-4	UGUUCUU	440, 376
Rz-6	GGGGUUU	572, 244
Rz-7	UCCCCUU	593, 223
Rz-9	GGACUCU	640, 176
Rz-11	UCGACUU	130, 686
Rz-12	GCCACCU	175, 641

<sup>a</sup> Ribozyme nomenclature corresponds to the mRNA site numbering.



**FIGURE 4: Cleavage of HDag mRNA by *delta* ribozymes.** **A)** Autoradiogram of HDag mRNA cleavage assays with all ribozymes. Randomly labelled mRNA was incubated with a 250 fold excess of ribozyme for 3 h at 37°C (see Materials and Methods). The cleavage products of Rz-1, -11 and -12 are indicated. Ori indicates origin of migration. **B)** Time course experiment illustrating an autoradiogram of Rz-12 under pre-steady-state conditions (i.e. 5  $\mu$ M ribozyme and 40 nM substrate). The time points in minute are indicated at the top of each lane. See Materials and Methods for detailed procedures. On the left of the gel the positions of the RNA molecular weight markers are indicated (nt).



The ability of the three active ribozymes to cleave the HDAG mRNA was further investigated under pre-steady-state conditions ( $[Rz] \gg [S]$ ) using various concentrations of ribozyme. An example of a time course experiment is shown in figure 4B, while the kinetic parameters are reported in table 3. Under the conditions used the observed catalytic rate constants ( $k_{cat}$ ) were almost identical, ranging between 0,012 to 0,03  $\text{min}^{-1}$ . The concentration of ribozyme at which the reaction velocity was half-maximal (apparent  $K_M$ ,  $K_M'$ ) varied slightly, ranging from 0,8  $\mu\text{M}$  for Rz-12, to 1,9  $\mu\text{M}$  for Rz-1 and to 4,9  $\mu\text{M}$  for Rz-11. Therefore, apparent second-order rate constants ( $k_{cat}/K_M'$ ) were calculated and found to be almost identical for Rz-1 and Rz-11, while Rz-12 appeared to be the most efficient ribozyme with its apparent second order rate constant being 5 and 16 fold more efficient than those of Rz-1 and Rz-11, respectively. The most active ribozyme (Rz-12) was also characterized under steady-state conditions ( $[S] > [Rz]$ ) in order to determine whether or not it exhibits a turnover. Various concentrations of mRNA ranging from 25 nM to 1000 nM were incubated in presence of a constant concentration of ribozyme (20 nM). Initial velocities ( $v_i$ ) were estimated at each substrate concentration, and the Michaelis-Menten constant ( $K_M$ ), the catalytic rate constant ( $k_{cat}$ ) as well as the  $k_{cat}/K_M$  ratio for the mRNA cleavage were calculated as being 550 nM, 0.012  $\text{min}^{-1}$  and  $2,2 \times 10^4 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}$ , respectively. Similar attempts to establish these kinetic parameters for both Rz-1 and Rz-11 did not permit accurate measurements owing to their low activities.

**TABLE 3.** Single turnover kinetic parameters of the active ribozymes. <sup>a</sup>

	mRNA substrate			11 nt substrate		
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_M'$ (M)	$k_{\text{cat}}/K_M'$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_M'$ (nM)	$k_{\text{cat}}/K_M'$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
Rz-1	0.015	1.9	$0.78 \times 10^4$	0.12	15	$8 \times 10^6$
Rz-11	0.012	4.9	$0.24 \times 10^4$	0.18	18	$10 \times 10^6$
Rz-12	0.030	0.8	$3.8 \times 10^4$	0.94	12	$78 \times 10^6$

<sup>a</sup> The values were calculated from at least two independent experiments, and standard variations were less than 15%.

## Cleavage of small substrates

In order to learn more about the activities of constructed ribozymes, we synthesized small model substrates with sequences corresponding to selected sites on HDAG mRNA (Table 4). Cleavage of the 11-nt long substrate yielded 5' and 3' products of 4 and 7 nucleotides, respectively. Trace amounts of end-labelled substrates (<1 nM) were incubated in the presence of an excess of ribozyme (250 nM), and the maximal cleavage percentages (end-point) determined as a comparative parameter. The observed maximal cleavage percents varied significantly between the different ribozymes (Table 4), suggesting that the sequence of both the substrate and the binding domain (stem P1) of the ribozyme strongly influences cleavage activity.

Surprisingly, Rz-1 did not cleave its wildtype small substrate, but cleaved the similar sequence within HDAG mRNA (see above). The substrate's 5' portion, which corresponds to positions -4 to -1 upstream to the cleavage site, harbors the sequence "CCCU". We suspect that these cytosines (position -4 to -2) can basepair with the opposite guanosines (positions 27 to 29) linking the P1 and P4 stems of the ribozyme (i.e J1/4 junction, see Fig. 1). If these basepairs are indeed formed, the ribozyme-substrate complex will most likely fold into an inactive conformation. Perhaps, these latter basepairs cannot be formed between Rz-1 and the HDAG mRNA because the cytosines are already involved in a double-stranded region within the mRNA molecule; consequently, the ribozyme may be active. In order to verify this hypothesis, mutant substrates with either "GGGC" or "GGGU" 5' end sequences were synthesized. These substrates were cleaved more efficiently by Rz-1, although at a different level showing a preference for a C as compared to U at position -1 (see Table 4). Similar mutant substrates were produced for several

ribozymes and yielded identical results with the exception of Rz-2 and -9 (see below). Higher guanosine residue content in the 5' end portion (i.e. positions -4 to -2) allows for more efficient cleavage as compared to the wildtype sequence which includes either C or U (Table 4). In contrast, we synthesized mutant substrates for Rz-12 in which a wildtype substrate harboring a "CAGU" 5' end was the most efficiently cleaved molecule. One or two cytosines were introduced in positions -3 or -2 and -3, respectively. The introduction of these cytosines yielded reduced values of end-point cleavage, particularly with the addition of the second cytosine. When the "CA" (position -4,-3) was replaced by "GG", the cleavage activity was better than that of the wildtype substrate.

Both the Rz-2 and -9 inefficiently cleaved (< 1%) both their wildtype substrates and G-rich mutant substrates (Table 4). These substrates share the characteristic of having a G at position +4 after the cleavage site. A recent study of the effect of alterations in the P1 stem on the kinetic and thermodynamic characteristics of *delta* ribozyme cleavage demonstrated that a G at position +4 of the substrate lead to inefficient cleavage, while the presence of any other base (i.e. A, C or U) allowed cleavage to occur, albeit at different level (S. Ananvoranich, D. Lafontaine and J.P. Perreault, unpublished data). This conclusion is in agreement with the results obtained with the various substrates. When a G is at position +4, the cleavage activity was limited to 1% or less, while with an A, C or U at this position give the maximal cleavage level.

**TABLE 4.** Cleavage of small substrates.<sup>a</sup>

Ribozyme		Substrate	End-point % cleavage
Rz-1	wt	5' CCCU↓GGCUGGG <sup>3</sup> '	<1
	m	<u>GGGC</u> ↓GGCUGGG	79
	m	<u>GGGU</u> ↓GGCUGGG	11
Rz-2	wt	CCGC↓GAAGAGG	<1
	m	<u>CGGC</u> ↓GAAGAGG	1
	m	<u>GGGC</u> ↓GAAGAGG	1
Rz-3	wt	CACC↓GACAAGG	4
	m	<u>GGGC</u> ↓GACAAGG	60
Rz-4	wt	CCUC↓GAGAACAA	1
	m	<u>GGGC</u> ↓GAGAACAA	50
Rz-6	wt	GUGU↓GAACCCC	21
	m	<u>GGGU</u> ↓GAACCCC	4
Rz-7	wt	GAUC↓GAGGGGA	24
Rz-9	wt	UCCC↓GGAGUCC	<1
	m	<u>GGGC</u> ↓GGAGUCC	<1
Rz-11	wt	GUCC↓GAGUCGA	3
	m	<u>GGGC</u> ↓GAGUCGA	55
Rz-12	wt	CAGU↓GGGUGGC	11
	m	<u>CCGU</u> ↓GGGUGGC	6
	m	<u>CCCU</u> ↓GGGUGGC	2
	m	<u>GGGU</u> ↓GGGUGGC	44

<sup>a</sup> The values were calculated from at least two independent experiments, and standard deviations were less than 15%. wt and m indicate wildtype or mutant substrates. Arrows indicate cleavage sites.

Finally, the three ribozymes capable of cleaving the mRNA (Rz-1, -11 and -12) were further characterized for their ability to cleave their respective small substrates under pre-steady-state conditions (Table 3). Both Rz-11 and -12 substrates harbor sequences identical to the mRNA, while the Rz-1 experiment was performed using a mutant substrate with a "GGGC" 5' end. The  $k_{cat}$  and  $K_M'$  values ( $0,12 \text{ min}^{-1}$  and  $15 \text{ nM}$ ) estimated for Rz-1 are almost identical to those recently reported for the same ribozyme in an independent experiment with a model substrate (e.g.  $0,13 \text{ min}^{-1}$  and  $16.7 \text{ nM}$ ; Ananvoranich & Perreault, 1998). Ribozymes-11 and -12 had similar  $K_M'$  values ( $18$  and  $12 \text{ nM}$ , respectively), while the  $k_{cat}$  values were slightly higher ( $0,18$  and  $0,94 \text{ min}^{-1}$ ) as compared to Rz-1. These ribozymes are several fold more active in their cleavage of the small substrates as compared to that of the full-length mRNA.

## DISCUSSION

In order to develop a gene-inactivation system capable of controlling HDV propagation, we have engineered *delta* ribozymes that specifically recognize and cleave the HDAG mRNA. In this report we address two issues: i. the selection of HDAG mRNA sequences that constitute the most suitable targets for *delta* ribozyme action; and, ii. the verification of whether or not the *delta* ribozyme can catalyse the cleavage of a natural mRNA in *trans*.

### Structural probing of a model target, the HDAG mRNA

In order to control HDV propagation via ribozyme cleavage it may appear more appropriate to target the genome itself. However, this RNA species is highly structured in nature, adopting a rod-like shape in which single-stranded regions are short (Lai, 1995); hence,

finding the appropriate sites to target is difficult. Therefore, we decided to target the unique mRNA of HDV, specifically the HDAG mRNA that is essential for both replication and viral packaging (Lai, 1995). Nevertheless, the identification of potential target sites on HDV mRNA specifically, or on any RNA molecule to be cleaved by a ribozyme in general (or to be target by an antisense), is a key step in the development of a gene-inactivation method at the RNA level (Campbell & Cech, 1995; Birikh et al., 1997). We identified the most likely sequences of the HDAG mRNA for ribozyme cleavage using various classical structure probing methods: computer secondary structure prediction, ribonuclease probing, binding shift assays and RNase H hydrolysis (Table 1). The active ribozymes (Rz-1, -11 and -12) that cleaved HDAG mRNA were those whose secondary structure probing gave consistent indications that the binding sites were located within single-stranded regions. These results confirm the importance of studying the structure of the target mRNA prior to the design of a ribozyme. With the exception of the computer secondary structure predictions, all structural methods gave valuable data regarding the accessibility of the target sites. However, none of the methods is ideal since they all bear some limitations. For example, nuclease probing gave accurate results, but is relatively tedious to perform, and allows only probing of the sites near the extremities. Based on the nuclease probing data, we selected sites 11 and 12, and both sites were efficiently cleaved by the respective ribozymes. In addition, some inconsistencies between the methods were observed and were probably the result of different reaction conditions. For example, no binding shift was observed for site 2, while the expected RNase H cleavage products were detected (see Table 1). It is possible that RNase H induced a conformational change of the mRNA rendering site 2 accessible for oligonucleotide binding and subsequent enzymatic hydrolysis. Although all tested methods have weaknesses, the combination of them appears the most promising strategy for designing active ribozymes. However, if a unique method

has to be performed, RNase H probing, which is rapid and easily performed, appeared to be the most accurate procedure. Similar conclusions were drawn from earlier studies (Birikh et al., 1997).

### ***Delta* ribozyme cleavage of HDag mRNA**

Among the nine tested ribozymes, three specifically cleaved the HDag mRNA (i.e. Rz-1, -11 and -12). Clearly, these results show that *delta* ribozyme can catalyse the cleavage of a natural mRNA in *trans*, at least *in vitro*. This is an original demonstration with *delta* ribozyme. Under steady-state conditions Rz-12 has a  $K_M$  value of 550 nM for the mRNA, which is comparable to that estimated for the cleavage of a small substrate (11 nt) by an almost identical *delta* ribozyme (S. Mercure and J.P. Perreault, unpublished data). In contrast, the  $k_{cat}$  value ( $0.012 \text{ min}^{-1}$ ) of Rz-12 for mRNA cleavage was 50 fold slower than that for the cleavage of the small substrate by the other ribozyme (i.e.  $k_{cat}$  of  $0.65 \text{ min}^{-1}$ ). These results suggest that the binding process is similar for both the small (11-nt) and larger (mRNA) substrates, but that the cleavage step occurs more slowly with the mRNA under steady-state conditions. The ability of the three active ribozymes to cleave both the HDag mRNA and their corresponding small substrates was also investigated under pre-steady-state conditions (Table 3). The mRNA cleavage gives average values of  $k_{cat}$  and apparent  $K_M$  of  $0.02 \text{ min}^{-1}$  ( $0.012\text{-}0.030 \text{ min}^{-1}$ ) and  $3 \text{ }\mu\text{M}$  ( $0.8\text{-}4.9 \text{ }\mu\text{M}$ ), respectively, compared to  $0.4 \text{ min}^{-1}$  ( $0.12\text{-}0.94 \text{ min}^{-1}$ ) and  $15 \text{ nM}$  ( $12\text{-}18 \text{ nM}$ ) for the small substrates. Single turnover results show that a larger concentration of mRNA ( $\sim 200$  fold) relative to the small substrate is required in order to saturate the ribozyme. However, even saturated ribozymes remained 20 fold slower in their cleavage of the mRNA as compared



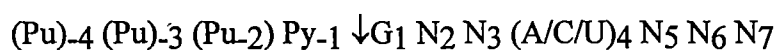
to that of the small substrates.

The differences in  $K_M$  between the pre-steady- and steady-state conditions with small substrates could indicate that the ribozyme-substrate (RzS) complex is undergoing a slow internal conformational rearrangement yielding an RzS' complex. We believe that under pre-steady-state conditions the conformational transition is bypassed, and that the reaction goes directly to RzS' complex formation prior to initiation. In contrast, under steady-state conditions, the  $K_M$  values were significantly higher suggesting that a large proportion of the RzS dissociates rather than going through the reaction steps. If this hypothetical mechanism is accurate, the kinetic data obtained indicates that the transition step occurred more slowly with the mRNA as compared to that of small substrates. Nevertheless, we clearly demonstrate that Rz-12 has a turnover. In other words, several mRNA molecules can be cleaved successively. This is an essential property for the further development of efficient ribozyme-based gene therapy.

### **Substrate specificity of *delta* ribozyme**

The compiled results for the cleavage of the small substrates established a purine preference in positions -4, -3 and -2. Unlike pyrimidines, these purines probably do not have the ability to basepair with the guanosines of the J1/4 junction. The formation of these basepairs may result in the folding of the RzS complex into an inactive structure. However, the purine rule in positions -4 to -2 is not absolute since at least two circumstances exist in which the presence of a pyrimidine in any position between -4 to -2 can be tolerated without ribozyme inactivation. Specifically, the presence of a pyrimidine in these positions is acceptable if these nucleotides are involved in a double-stranded structure with another

region of the mRNA, as is proposed for site 1 within the HDAG mRNA; or if the two pyrimidines are not consecutive. Most likely the presence of only one basepair is not sufficient to stabilize the inactive structure (e.g. Rz-12). It seems that positions -2, -3 and -4 can tolerate a pyrimidine provided it is not followed by a second pyrimidine. Considering the requirement for a guanosine immediately after the cleavage site for formation of a wobble basepair, and the 6 to 7 consecutive basepairs forming the P1 stem (Been & Wickham, 1997), we may summarize the substrate specificity as being the following:



where Pu and Py indicate purine and pyrimidine, N is for any nucleotide that can basepair with the ribozyme, and the parenthesis indicate that the nucleotide is not exclusively restricted to being a purine (see above). The P1 domain is composed of the nucleotides that basepair with the ribozyme; hence, these nucleotides can be defined as internal determinants of substrate specificity. Several investigations have been performed addressing the questions related to the P1 domain specificity. It has been demonstrated that cleavage activity was not destroyed by the interchange of one to four nucleotide pairs between the substrate and the ribozyme (Perrotta & Been, 1991; Wu et al., 1992; Perrotta & Been, 1992; Been et al., 1992). However, we have recently shown a clear preference for C, U or A at position +4 of the substrate in order for the cleavage to occur (Ananvoranich & Perreault, 1998; S. Ananvoranich, D. Lafontaine and J.P. Perreault, unpublished data). In contrast, the nucleotides upstream of the cleavage site should not basepair with the ribozyme (i.e positions -4 to -1). These nucleotides do not directly contribute to substrate recognition (e.g substrate binding), however, they do play a role in "proofreading" as they can allow folding into either an active or inactive structure. Indeed, the identity of these nucleotides is essential for efficient cleavage, therefore they contribute to substrate specificity, likely as external determinants.

## CONCLUSION

In this report we demonstrate the ability of *delta* ribozyme to catalyze, in *trans*, the specific cleavage of a full-length mRNA. *Delta* ribozyme offers the advantage of having the natural ability to function in the presence of human proteins; therefore, it can be considered as a suitable ribozyme for gene therapy development. Furthermore, the results presented here shed light on new features that contribute to the substrate specificity of *delta* ribozyme cleavage. Although both the study of the molecular mechanism and the ability of the engineered *delta* ribozymes to cleave *in vivo* need to be pursued, this work clearly illustrates the potential of this ribozyme as a therapeutic tool.

## MATERIALS AND METHODS

### Sequence alignment and computer structure prediction

All mRNA sequences available as of January 1997 from the public viroid and viroid-like RNA databases were retrieved (<http://www.callisto.si.usherb.ca/~jpperra>; Lafontaine et al., 1997) and aligned using the ClustalW package (version 1.6; Thompson et al., 1994). Potential target sites (i.e. these including the sequence PyGN<sub>6</sub> and conserved in more than 80% of the variants) were identified (Table 1). Secondary structures of the complete HDAG mRNA sequence were compiled using the Mfold program (version 2.3; <http://www.ibc.wustl.edu/~zucker>; Zuker, 1989).

## Plasmids encoding the HDag mRNA and *delta* ribozymes

The pKSAgS plasmid carries the S-HDAg mRNA in pBluescript KS+ (Stratagene). Briefly, the S-HDAg mRNA insert (positions 900 to 1679 of the vHDV.5 variant (according to Lafontaine et al., 1997) was retrieved by PCR amplification using pSVL(AgS) (generously provided by Dr. John Taylor; Chao et al., 1990) as template. The oligonucleotides used in this PCR had restriction sites at their 5' ends so as to facilitate subsequent cloning: HDV1679.66: 5'CCGGATCCCTCGGGCTCGGGCG 3' (underlined is the *Bam* HI restriction site) and HDV900.914: 5'CCAAGCTTCGAAGAGGAAAGAAG 3' (underlined is the *Hind* III restriction site). Plasmid DNA (pSVL(AgS), 50 ng), 0.4 mM of each oligonucleotide, 200 mM dNTPs, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, and 1 U Taq DNA polymerase were mixed together in a final volume of 100 µL. We performed one low stringent PCR cycle (94°C for 5 min, 53°C for 30 s, 72°C for 1 min), followed by 35 cycles at higher stringency (94°C for 1 min, 62°C for 30 s, 72°C for 1 min). The mixture was fractionated by electrophoresis in a 1% agarose gel in 1X TBE buffer (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA pH 8.0), the expected band was then excised and eluted using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen), and finally digested and ligated into pBluescript KS+. The strategy used for the construction of plasmids carrying ribozymes with modified substrate recognition domains has been described previously in the Results section. All constructs were verified by DNA sequencing.

## RNA Synthesis

*In vitro* transcription: HDag mRNA was transcribed from *Hind* III-linearized pKSAgS, while ribozymes were transcribed from *Sma* I-linearized ribozyme encoding plasmids. *In*

*vitro* transcriptions were performed with T7 RNA polymerase with or without 50  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]GTP (Amersham) under conditions described previously (Ananvoranich & Perreault, 1998). The mRNA and ribozyme products were purified on denaturing 4% and 15% polyacrylamide gels (PAGE, 19:1 ratio of acrylamide to bisacrylamide), respectively, containing 1X TBE and 7 M urea. The *in vitro* transcription products were visualized by autoradiography or UV shadowing. Bands were excised and eluted overnight at 4°C in 0.5 M ammonium acetate, 0.1% SDS solution. Transcripts were then ethanol precipitated, washed, dried and the quantity determined by either spectrophotometry at 260 nm or  $^{32}\text{P}$  counting.

Small substrate synthesis: Small substrates (11-nt) were synthesized either by *in vitro* transcription from templates formed by two annealed oligonucleotides as described previously (Ananvoranich & Perreault, 1998), or chemically on an automated oligonucleotide synthesizer (Keck Biotechnology Resource Laboratory, Yale University) and then deprotected according to a procedure reported previously (Perreault & Altman, 1992). Substrates were purified on 20% denaturing PAGE gels as described above.

### **Ribonucleases probing**

Messenger RNA transcribed *in vitro* was dephosphorylated with calf intestine alkaline phosphatase (Pharmacia) and then 5'-end labelled with T4 polynucleotide kinase (Pharmacia) in the presence of 10  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (Amersham). Alternatively the mRNA was 3'-end labelled in the presence of 10  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]Cp (Amersham) and T4 RNA ligase (Pharmacia) according to the manufacturer's recommended protocols. Both the 5'- and 3'-

end labelled transcripts were purified by 4% denaturing PAGE, and recovered from the gels as described above. For ribonuclease partial hydrolysis 5'- or 3'-end labelled mRNA (~ 60 000 cpm; < 1 nM) and 1 µg of *E. Coli* tRNA added as carrier were resuspended in 4 µl of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl solution. The reactions were initiated by the addition of 1 µl of ribonuclease T1 (0.2 U) or V1 (0.007 U), both purchased from Pharmacia. Aliquots (1.5 µl) were removed at different time intervals, added to stop-solution (4 µL of 97% formamide, 10 mM EDTA, 0.25% bromophenol blue and 0.25% xylene cyanol) and then immediately frozen at -20°C. An RNA ladder was produced by alkaline hydrolysis of the mRNA. The samples were fractionated by 8% denaturing PAGE as described previously, and the dried gels autoradiographed.

### **Oligonucleotides probing**

DNA oligonucleotides complementary to the potential target sites were purchased from Gibco-BRL and 5'-end labelled using T4 polynucleotide kinase (Pharmacia) in the presence of 10 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Labelled oligonucleotides (~ 2 500 cpm; ~ 0.05 nM) and unlabelled mRNA (2.4 to 1 200 nM) were hybridized for 10 min at 25°C in a solution containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5 and 10 mM MgCl<sub>2</sub> in a final volume of 15 µl. Loading solution (2 µL of 1X TBE, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 40% glycerol, 0.25% bromophenol blue and 0.25% xylene cyanol) was added, and the resulting solutions fractionated on native 5% PAGE gels (30:1 ratio of acrylamide to bisacrylamide, 50 mM Tris-borate pH 8.3, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 5% glycerol) at 4°C in the presence of recirculating 50 mM Tris-borate pH 8.3 and 10 mM MgCl<sub>2</sub> buffer. The dried gels were analyzed with the aid of a PhosphorImager (Molecular Dynamics). RNase H probing was performed with the same oligonucleotides. In these experiments randomly labelled S-HDAg mRNA (~10 000 cpm; ~10 nM) and

unlabelled oligonucleotides (1  $\mu$ M) were annealed as described for the gel shift assays for 10 min, then 0.2 U of *E. Coli* RNase H (Pharmacia) was added and the reaction incubated at 37°C for 20 min. The reactions were stopped by the addition of stop-solution (3  $\mu$ L), fractionated on 5% denaturing PAGE gels, and analyzed by autoradiography.

### ***In vitro* cleavage assays and kinetic analyses**

Cleavage assays were performed at 37°C under single turnover conditions using either randomly labelled mRNA (~ 10 nM) or 5'-end labelled small substrates (<1nM), and an excess of ribozyme (2,5  $\mu$ M) in 10  $\mu$ L final volume containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 10 mM MgCl<sub>2</sub>. A pre-incubation of 5 min at 37°C preceded the addition of the Tris-magnesium buffer which initiates the reaction. After an incubation of 1 to 3 hrs at 37°C, stop-solution (5  $\mu$ L) was added and the mixture quickly stored at -20°C until its fractionation on 5% denaturing PAGE gels and subsequently autoradiography.

Active ribozymes (Rz-1, -11 and -12) were characterized under single turnover conditions essentially as described previously (Ananvoranich & Perreault, 1998; Hertel et al., 1996). Briefly, either randomly labelled mRNA (20 nM or 40 nM), or trace amounts of the corresponding 5'-end labelled small model RNA substrate (11-nt; < 1 nM), were mixed with various amounts of unlabelled ribozyme (0.5  $\mu$ M to 10  $\mu$ M for mRNA; 5 nM to 250 nM for small substrates), and the volume adjusted to 18  $\mu$ L with H<sub>2</sub>O. The mixtures were pre-incubated for 5 min at 37°C before starting the reaction as described above. Aliquots (2  $\mu$ L) were periodically removed, added to stop-solution (5  $\mu$ L), quickly frozen and analyzed by 5% (mRNA) or 20% (small substrate) denaturing PAGE gels. Substrate and product bands were quantified with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). Rate constants ( $k_{obs}$ ) were determined and kinetic parameters estimated ( $k_{cat}$  and  $K_M'$ ) as described

previously (Ananvoranich & Perreault, 1998; Hertel et al., 1996). The maximal cleavage (i.e. end-point) of 250 nM of small substrates were similarly determined with several other ribozymes. Finally, Rz-12 was studied under multiple turnover conditions. Briefly, an excess of unlabelled mRNA (25 nM to 1000 nM) and randomly labelled mRNA (20 nM) were incubated with a constant concentration of ribozyme (20 nM). The conditions were similar to those described above with the exception that initial velocities were determined using the linear proportion of the cleavage curves, and  $k_{cat}$  and  $K_M$  were calculated by standard Lineweaver-Burk plots.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. John Taylor (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia) for providing us with the plasmid carrying the HDV sequence. We also thank Dr. Stéphane Mercure and M. Jacques Lehoux for the construction of the cassette-minigene, and Dr. Sirinart Ananvoranich for helpful discussions and comments on the manuscript. This work was sponsored by a grant from Medical Research Council (MRC) of Canada to J.P.P. G.R. is recipient of a studentship from Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. J.P.P. is an MRC scholar.



## REFERENCES

- Ananvoranich, S., Perreault, J.-P. 1998. Substrate specificity of *delta* ribozyme cleavage. *J. Biol. Chem.*, 273:13182-13188.
- Been, M.D., Wickham, G.S. 1997. Self-cleaving ribozymes of hepatitis *delta* virus RNA. *Eur. J. Biochem.*, 247:741-753.
- Been, M.D., Perrotta, A.T., Rosenstein, S. P. 1992. Secondary structure of the self-cleaving RNA of hepatitis *delta* virus : applications to catalytic RNA design. *Biochemistry*, 31:11843-11852.
- Birikh, K.R., Berlin, Y.A., Soreq, H., Eckstein, F. 1997. Probing accessible sites for ribozymes on human acetylcholinesterase RNA. *RNA*, 3:429-437.
- Campbell, T.B., Cech, T.R. 1995. Identification of ribozymes within a ribozyme library that efficiently cleave a long substrate RNA. *RNA*, 1:598-609.
- Chao, M., Hsieh, S.Y., Taylor, J. 1990. Role of two isoforms of hepatitis *delta* virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J. Virology*, 64:5066-5069.
- Chowrira, B.H., Pavco, P.A, McSwiggen, J.A. 1994. *In vitro* and *in vivo* comparison of hammerhead, hairpin and hepatitis *delta* virus self-processing ribozymes cassettes. *J. Biol. Chem.*, 269:25856-25864.
- Hadziyannis, S.D. 1997. Hepatitis *delta*. *J. Gastroenterology and Hepatology*, 12:289-298.
- Hertel, K.J., Herschlag, D., Uhlenbeck, O.C. 1996. Specificity of hammerhead cleavage. *EMBO J.*, 15:3751-3757.
- Hogrefe, H.H., Hogrefe, R.I., Walder, R.Y., Walder, J.A. 1990. Kinetics analysis of *Escherichia coli* RNase H using DNA/RNA-DNA/DNA substrates. *J. Biol. Chem.*, 265:5561-5566.

- Lafontaine, D., Mercure, S., Perreault, J.-P. 1997. Update of the viroid and viroid-like sequence database: addition of the hepatitis *delta* RNA section. *Nucleic Acids Res.*, 25:123-125.
- Lai, M.M.C. 1995. The molecular biology of hepatitis *delta* virus. *Annu. Rev. Biochem.*, 64:259-286.
- Mercure, S., Lafontaine, D., Roy, G., Perreault, J.-P. 1997. Le motif autocatalytique d'ARN du virus *delta* de l'hépatite humaine. *Médecine/Sciences*, 13:662-669.
- Pattnaik, A.K., Ball, L.A., LeGrone, A. W., Wertz, G.W. 1992. Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell*, 69:1011-1020.
- Perreault, J.-P., Altman, S. 1992. Important 2'-hydroxyl groups in model substrate for M1 RNA, the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 226:399-409.
- Perrotta A.T., Been, M.D. 1991. A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis *delta* virus RNA. *Nature*, 350:434-436.
- Perrotta A.T., Been, M.D. 1992. Cleavage of oligoribonucleotides by a ribozyme derived from the hepatitis virus RNA sequence. *Biochemistry*, 31:16-21.
- Perrotta A.T., Been, M.D. 1996. Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage. *Nucleic Acids Res.*, 24:1314-1321.
- Roy, G., Anavaranich, S., Perreault, J.-P. 1997. Design of ribozymes to selectively cleave the human hepatitis *delta* virus mRNA. *Nucleic Acids Symposium Series*, 36:93-95.
- Thompson J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J. 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-80.

- Wu, H.N., Wang, Y.J., Hung, C.F., Lee, H.J., Lai, M.C.C. 1992. Sequence and structure requirement of the catalytic RNA of the hepatitis *delta* virus genomic RNA. *J. Mol. Biol.*, 223:233-245.
- Zuker, M. 1989. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*, 244:48-52.

### **3. DISCUSSION**

L'objectif de notre étude était de développer des ribozymes *delta* qui permettent l'inactivation de l'unique ARNm du virus de l'hépatite *delta* humaine (VHD) et par le fait même d'approfondir les connaissances quant à la spécificité de ce ribozyme. À ce jour, l'utilisation du ribozyme *delta* en tant qu'outil moléculaire catalysant le clivage en *trans* d'un ARNm naturel n'avait jamais été montré et les éléments de spécificité de clivage et reconnaissance du substrat demeuraient plutôt nébuleux.

#### **3.1 IDENTIFICATION DES SITES CIBLES: ÉTUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE**

Une problématique pour l'inhibition de l'expression d'un gène à l'aide de ribozymes est l'identification des séquences cibles potentielles sur l'ARN d'intérêt (substrat) que le ribozyme reconnaîtra et clivera (section 1.3.1). Il est préférable que ces séquences soient situées dans des régions simple brin de la structure de l'ARN pour faciliter l'appariement du ribozyme (Campbell et Cech, 1995; Birikh et *al.*, 1997b). Pour cette raison, nous nous sommes attardé au choix des séquences qui serviront de substrats en étudiant leur accessibilité dans la structure de l'ARN d'intérêt avant de procéder à la construction des ribozymes. La stratégie que nous avons élaborée pour l'identification des sites cibles et pour la construction des ribozymes est principalement décrite en annexe (section 6.1) alors que les résultats obtenus sont présentés à la section 2.1.

L'accessibilité de séquences présélectionnées (section 2.1 et 6.1) dans la structure secondaire de l'ARNm HDAG a été étudiée à l'aide de diverses méthodes telles que la prédiction de structure secondaire par ordinateur, des essais de susceptibilité aux

ribonucléases (RNases), des essais de rétention sur gel et des essais de RNase H. La combinaison des résultats de structure secondaire obtenus ont permis de choisir neuf séquences pour la construction de ribozymes contre l'ARNm HDAG. Nous avons clairement démontré (section 2.1) que seules les séquences cibles qui nous apparaissaient simple-brin par combinaison de toutes les données de structure secondaire ont conduit à l'obtention de ribozymes actifs (Rz-1, 11 et 12). Il est possible de détecter les produits de clivage spécifiques de ces ribozymes. Ces résultats confirment donc l'importance d'étudier la structure secondaire de l'ARN cible avant la construction de ribozymes.

Chaque méthode d'étude de la structure secondaire a ses points forts et ses points faibles et les résultats qui en découlent ne sont pas garants du succès des ribozymes à développer. Par exemple, l'existence d'appariements homopurine ou non-conventionnel dans l'ARN est connue (Saenger, 1984) mais les programmes de prédiction de structure, tel que celui utilisé (*Mfold*; Zuker, 1989), ne prédisent pas ce genre de structure et/ou d'appariements. Les essais de susceptibilité aux RNases permettent de voir avec une certaine précision si une région est simple brin ou double brin, par contre, ils sont très difficiles à mettre au point et ils sont limités par la taille de la molécule d'ARN qui peut être fractionnée sur gel. L'avantage des essais de rétention sur gel à l'aide de courts oligodésoxynucléotides complémentaires aux séquences cibles potentielles est qu'ils miment l'association du ribozyme à son substrat. Par contre, certains oligonucléotides peuvent lier l'ARNm et donner un complexe retardé alors que ce dernier résulte d'une association non spécifique. De plus, l'oligonucléotide est en ADN et peu structuré alors que le ribozyme est en ARN et hautement structuré, ce qui peut résulter en une affinité de liaison différente. Enfin, les essais de RNase H semblent prometteurs tel que rapporté précédemment par Birikh et *al.* (1997b) mais il est possible de détecter des produits de

clivage autres que ceux attendus (site 7). Il demeure, néanmoins, que cette méthode donne des résultats facilement et rapidement. Il ne semble donc pas y avoir de méthode d'étude de la structure secondaire supérieure aux autres pour l'identification des sites cibles. À notre avis, la combinaison de ces approches est donc la stratégie la plus prometteuse pour l'identification de sites cibles qui conduisent à l'obtention de ribozymes fonctionnels. Tel que mentionné ci-dessus, seuls les trois ribozymes actifs reconnaissent des sites donnant des résultats consistants quant à leur accessibilité dans la structure secondaire (section 2.1).

Malgré des résultats encourageants, il est long et ardu de procéder à une étude relativement poussée de la structure secondaire d'un ARNm. Dans des études futures, des approches plus simples et plus rapides devraient donc être envisagées pour le développement de ribozymes contre divers ARN. Par exemple, une banque de ribozymes contenant un nombre immense de séquences de reconnaissance du substrat pourrait être utilisée pour cribler les sites cibles potentiels sur l'ARN d'intérêt. De plus, une banque d'oligonucléotides dégénérés pourrait être utilisée afin de cibler les sites accessibles en combinaison avec la RNase H tel qu'expérimenté par Birikh et *al.* (1997b). Par ailleurs, il est possible que la structure de l'ARNm *in vitro* diffère de celle *in vivo* même si des évidences démontrent le contraire (Birikh et *al.*, 1997a), ce qui remet en cause la pertinence d'étudier la structure de l'ARNm *in vitro*. En effet, dans une cellule, il est possible que l'ARN d'intérêt se replie différemment parce qu'il interagit avec une ou plusieurs protéines ou encore parce que les conditions physiologiques d'ions, de pH et de "tampon" ne correspondent pas à celle utilisée dans un tube à essai. Cependant, des essais de clivage en présence d'un extrait protéique brut de cellules Hep G2 (hépatoblastome humain) ont été effectués et les résultats quant à l'activité des ribozymes construits demeurent inchangés. Dans le futur, des stratégies permettant de sélectionner directement

les ribozymes *in vivo* seraient à privilégier pour pallier aux différences probables de structure *in vitro* et *in vivo*. Récemment, l'équipe du Dr. Cedergren (Chen et *al.*, 1997) a d'ailleurs tenté l'identification de ribozymes *hammerhead* actifs dans des bactéries *Escherichia Coli* en culture.

## 3.2 CARACTÉRISATION DES RIBOZYMES CONSTRUITS

### 3.2.1 Clivage de l'ARNm HDAG

Les ribozymes construits ont été soumis à diverses caractérisations biochimiques afin de déterminer leurs paramètres cinétiques pour le clivage de l'ARNm HDAG *in vitro* (section 2.1). Le Rz-12 est le plus actif et inactive 53% de l'ARNm en 2h à 37°C, alors que dans les mêmes conditions les Rz-1 et 11 clivent respectivement 15 et 5% de l'ARNm. Les paramètres cinétiques des ribozymes clivant l'ARNm ont été déterminés en conditions de *turnover* simple (en présence d'un excès de ribozyme) alors que pour le Rz-12, des essais en conditions de *turnover* multiple (en présence d'un excès de substrat) ont également été effectués. Nous avons démontré que le Rz-12 possède un *turnover*, c.a.d. qu'une molécule de ribozyme inactive plus d'une molécule de substrat. Dans ce cas, 6 *turnover* sont observés en 3h, ce qui signifie qu'un ribozyme clive 6 molécules de substrats dans cette période de temps. Quoi qu'ayant un *turnover* relativement faible en comparaison avec les enzymes protéiques, il s'agit néanmoins d'un avantage marqué par rapport aux stratégies d'oligonucléotides antisens où un oligonucléotide s'apparie à un seul substrat (Kijima et *al.*, 1995). De plus, le ribozyme clive de façon irréversible sa cible et non un antisens.

Nous avons observé que les ribozymes actifs (Rz-1, 11 et 12) reconnaissent des sites localisés près de l'extrémité 5' de l'ARNm tel qu'observé par Ohkawa et *al.* (1997).

Leur hypothèse veut que cette région de l'ARNm soit plus accessible étant donné que le site d'initiation de la traduction doit être repéré facilement par le ribosome ce qui corrèle bien avec nos résultats. En fait, cette localisation en 5' constitue un avantage puisque le cadre de lecture ouvert est interrompu de façon précoce, ce qui augmente les chances de perte totale d'activité de la protéine codée.

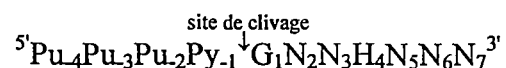
### 3.2.2 Clivage de courts substrats d'ARN

Afin de mieux comprendre l'inactivité de certains ribozymes à cliver l'ARNm HDAG, de courts substrats d'ARN (11 nt) de séquences correspondantes à l'ARNm ou portant des mutations ont été utilisés dans des essais de clivage *in vitro* (section 2.1). À l'aide de ces courts substrats, nous avons démontré deux choses principales: la paire de bases U-A (formée par l'appariement ribozyme-substrat; position 23 du ribozyme et position +4 du substrat; figure 1 de la section 2.1) identifiée par Ananvoranich et Perreault (1998) ainsi que les nucléotides en 5' du site de clivage ont un rôle crucial dans le maintien de l'activité catalytique du ribozyme *delta* (section 2.1). En effet, les ribozymes actifs pour cliver l'ARNm (Rz-1, 11 et 12) forment tous cette paire de base U-A en s'appariant à leur substrat, l'ARNm HDAG. Cependant, de nouveaux résultats de notre groupe supportent le fait que n'importe quelle base, à l'exception d'une guanine, peut être tolérée en position 23 du ribozyme *delta* afin d'en maintenir l'activité (Ananvoranich et *al.*, résultats non publiés). Ces résultats corrélaient bien avec ceux obtenus quant à l'activité des ribozymes construits lors du clivage de courts substrats synthétiques. Rz-2 et -9 sont inactifs et possèdent une guanine en position 23. L'identité de cette base semble donc essentielle pour l'activité de clivage et devrait être prise en considération lors de la construction de futurs ribozymes *delta* contre divers ARN.



Quant aux nucléotides en 5' du site de clivage, principalement les positions -4 à -1, ils doivent être préférentiellement des purines (Pu) afin d'éviter un possible appariement avec les guanosines en position 27 à 29 du ribozyme (Figure 1, section 2.1). Un tel appariement a pour conséquence d'inactiver le ribozyme. La portion 5' du substrat ne fait pas partie du domaine formant des paires de bases avec le ribozyme mais pourrait être considérée comme un déterminant externe nécessaire pour l'activité et ainsi contribuer à augmenter la spécificité du ribozyme *delta*. Lorsque la portion 5' est "compatible", le complexe ribozyme-substrat peut passer à un état de transition permettant le clivage du substrat. Si cette portion est "non-compatible", le complexe formé est bloqué dans un état ne permettant pas le clivage. Ce serait en quelque sorte un mécanisme de correction (*proofreading*). Malgré de nouveaux éclaircissements quant à la spécificité du ribozyme *delta*, l'effet d'un nombre important de modifications, comme c'est le cas pour les ribozymes construits, demeurent encore obscure.

De façon générale, les résultats que nous avons obtenus ainsi que d'autres résultats de notre groupe (Ananvoranich et Perreault (1998); Ananvoranich et *al.*, non-publiés) permettent de croire qu'en réalité la spécificité du ribozyme *delta* diffère grandement de celle démontrée dans des études ultérieures, c.a.d. PyGN<sub>6</sub> (Perrotta et Been, 1996). À la lumière de nos études nous proposons que la spécificité du ribozyme *delta* soit définie de la façon suivante (les chiffres indiquent les positions):



### 3.3 LE RIBOZYME PARFAIT: SPÉCIFICITÉ ET *TURNOVER* MAXIMUMS

La spécificité et le *turnover* (c.a.d. la capacité pour une molécule de ribozyme à inactiver plus d'une molécule de substrat) sont pour l'instant des limites importantes pour l'utilisation des ribozymes comme agents thérapeutiques (Rossi, 1995). Un ribozyme idéal devrait posséder deux caractéristiques principales: avoir une spécificité élevée pour sa séquence cible (capacité de discriminer sa cible parmi une population hétérogène d'ARN) et avoir un *turnover* élevé (inactiver plusieurs molécules de substrats; Herschlag, 1991). Le *turnover* étant l'avantage principal des ribozymes par rapport aux antisens (Kijima et *al.*, 1995). Si l'on considère avantageux de cibler directement l'ARN plutôt que l'ADN puisque seulement 1-2% du matériel génétique est exprimé dans un type cellulaire particulier, la séquence minimale requise pour reconnaître une séquence unique parmi la population d'ARN exprimé est de 11 à 15 nt (Herschlag, 1991). Il est également plus avantageux de cibler l'ARN exprimé que le gène correspondant puisqu'un tort irréversible au patrimoine génétique d'un individu est évité. Il est primordial qu'un ribozyme utilisé comme outil thérapeutique reconnaisse une séquence unique afin d'éviter l'inactivation non-souhaité de tout autre ARN, ce qui pourrait être très dommageable. Cependant, il se trouve que cette taille critique de 11 à 15 nt est plus élevée que la taille optimale (7 pb) pour que la dissociation des produits du complexe ribozyme-produits de clivage ne soit pas limitante, ce qui entraîne une diminution du *turnover* (Herschlag, 1991; Sioud, 1997). Plus la séquence de reconnaissance du ribozyme est longue (plus grand nombre de paires de bases formées entre l'ARN cible et le ribozyme), plus la probabilité de rencontrer cette même séquence sur un autre ARN dans une population diminue. Cependant, plus le nombre de paires de bases formées augmentent, plus la dissociation des produits devient limitante et plus le *turnover* diminue. Il faut donc trouver l'équilibre parfait entre meilleure

discrimination de la séquence cible parmi une population et inactivation d'un plus grand nombre possible de cible par ribozyme.

Si l'on compare les différents ribozymes connus (section 1.2.1) quant à leur spécificité et *turnover*, le ribozyme *delta* semble être le plus avantageux à la lumière des nouveaux résultats de notre groupe alors que ce ribozyme est, en fait, le moins étudié. À prime abord, ce ribozyme a été rejeté puisqu'on croyait qu'il ne possédait qu'une courte séquence peu restreinte de reconnaissance du substrat (c.a.d. PyGN<sub>6</sub>) formant 7 pb par appariement au substrat, ce qui est en deçà de la taille requise pour une bonne spécificité (voir ci-dessus). Le potentiel des ribozymes *hammerhead*, *hairpin* et de la RNase P a donc été exploité davantage devant l'attrayante séquence de reconnaissance qu'ils possédaient (Tableau II et figures 4 à 7 de la section 1.2.1), cette séquence variant de 12 à 16 nt. Cependant, de nombreux problèmes se sont présentés. Chez *Escherichia Coli*, la RNase P demande une hélice de 6 pb pour son activité (Perreault et Altman, 1991) alors que chez l'humain, une hélice de moins de 12 pb n'a jamais été rapportée comme étant fonctionnelle. La dissociation des produits est donc limitante et le *turnover* est pratiquement nul. Quant au *hairpin* et au *hammerhead*, le fait que le duplexe formé par l'appariement du substrat soit en deux domaines de moins de 7 pb (Tableau II; figures 5 et 6 de la section 1.2.1; James et Gibson, 1998) n'est donc pas un obstacle pour le *turnover*. Puisque la séquence reconnue est de 12 nt, la spécificité est également assez grande. Le désavantage majeur de ces ribozymes, dérivés d'agents pathogènes localisés dans les chloroplastes de plantes, est qu'ils nécessitent de grandes quantités d'ions magnésium pour être pleinement fonctionnels, c.a.d. ~10-100 mM (Chowrira et al., 1994). Cette concentration est au-delà de la concentration physiologique de magnésium (~1mM) dans les cellules de mammifères (Chowrira et al., 1994). Les oligonucléotides antisens peuvent

avoir la taille désirée, leur spécificité n'est donc pas problématique, par contre ils n'ont pas de *turnover* (Kijima et *al.*, 1995). Le ribozyme *delta* est donc le ribozyme idéal pour les raisons suivantes: i) il est fonctionnel à des concentrations physiologiques de magnésium (Perrotta et Been, 1990) et en présence de protéines cellulaires humaines puisqu'il origine d'un agent pathogène humain, ii) le domaine de liaison au substrat forme 7 pb, ce qui est la taille idéale pour le *turnover* (Herschlag, 1991) et enfin iii) en considérant les déterminants externes (discuté ci-dessus), c.a.d. les nucléotides (-4 à -1) en amont du site de clivage, le domaine de reconnaissance du substrat a une taille de 11 nt, ce qui est garant de la reconnaissance d'une séquence unique dans une population d'ARN cellulaire.

**TABLEAU II. Comparaison des séquences reconnues et de la contribution au nombre d'appariement de ces séquences de divers ribozymes.**

Ribozyme	Séquence reconnue	longueur en nt	Nombre de paires de bases formées
RNase P	N <sub>13</sub> CCA	16	12
<i>hammerhead</i>	N <sub>5</sub> UHN <sub>5</sub>	12	10
<i>hairpin</i>	N <sub>4</sub> CUG N <sub>5</sub>	12	8
<i>delta</i>	Pu <sub>3</sub> PyGN <sub>2</sub> HN <sub>3</sub>	11	7

### 3.4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

À notre connaissance, notre étude montre pour la première fois l'utilisation du ribozyme *delta* en *trans* contre un ARNm naturel, l'ARNm HDAG, et met en lumière de nouveaux éléments quant à la spécificité de reconnaissance du substrat par le ribozyme *delta*. Cependant, de plus amples études quant à l'activité et à la spécificité du ribozyme *delta* sont requises afin d'élucider avec précision les éléments nécessaires pour une spécificité et une activité maximale. Dans le but à long terme d'étudier le potentiel des ribozymes construits en tant qu'outils thérapeutiques pour l'inhibition de la propagation du VHD, l'activité de ceux-ci devra être vérifiée dans des cellules en culture exprimant l'ARNm de l'HDAG. L'établissement d'une lignée stable de cellules Hep G2 exprimant cet ARNm a d'ailleurs été entreprise à cet effet. Afin de vérifier l'activité de ces ribozymes en culture cellulaire, des nucléotides modifiés, particulièrement aux extrémités 5' et en 3', pouvant conférer une certaine résistance à l'action des ribonucléases devraient être utilisés (Boutorine et *al.*, 1994; Thaler et *al.*, 1996). L'activité de ces ribozymes modifiés devra également être étudiée afin de s'assurer que les modifications introduites ne réduisent pas l'activité des ribozymes. Dans un but thérapeutique, ces ribozymes pourraient être utilisés en combinaison afin d'inactiver au maximum l'ARNm HDAG. Il serait donc intéressant de vérifier l'action combinée des trois ribozymes actifs (Rz-1, 11 et 12) sur le taux de clivage de l'ARNm autant *in vitro* qu'en culture cellulaire. Les ribozymes construits pourraient avoir une double fonction: ils pourraient également cibler l'antigénome du VHD et ralentir considérablement la réplication en cercle roulant, il serait donc intéressant de vérifier cette hypothèse. Enfin, les ribozymes construits dans cette étude pourraient s'avérer un bon point de départ dans une longue étude quant à l'exploitation du potentiel du ribozyme *delta* en tant qu'outil thérapeutique contre le VHD ou contre tout autre ARN indésirable.

#### **4. REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier tout particulièrement le superviseur de mes travaux de maîtrise, le Dr. Jean-Pierre Perreault, qui m'a accueilli dans son laboratoire, qui a eu confiance en moi et qui m'a soutenu tout au long de mon cheminement. Je remercie aussi tout particulièrement Mme Danièle Beaudry pour tout ce qu'elle m'a appris à mes tous débuts et pour son amitié. Je remercie tous mes collègues de laboratoire présents et passés pour leur support technique et moral; Véronique, Daniel, Stéphane, Frédéric, Fabien, Sirinart, Jacques et tous les stagiaires. Je remercie Jude Beaudoin pour m'avoir transmis ses connaissances en culture cellulaire. Je remercie aussi tous mes collègues du département pour leurs réponses à mes nombreuses questions, particulièrement les membres des laboratoires des Drs. Lehoux, Boissonneault et Lavigneur. Je remercie également les correcteurs de ce mémoire; les Drs. Perreault, Boissonneault et Abou-Elela. Enfin, je remercie plus spécialement mes parents, ma soeur, Fernand et mes amies Annie, Véronique et Denise pour leur soutien et leurs encouragements constants. Merci à vous tous.

## **5. RÉFÉRENCES**

- Ananvoranich, S., Perreault, J.-P. (1998). Substrate specificity of *delta* ribozyme cleavage. *J. Biol. Chem.*, **273**:13182-13188.
- Bartolomé, J., Madejon, A., Carreno, V. (1995). Ribozymes: structure, characteristics and use as potential antiviral agents. *J. Hepatology*, **22** (suppl.1):57-64.
- Been, M.D., Wickham G.S. (1997). Self-cleaving ribozymes of hepatitis *delta* virus RNA. *Eur. J. Biochem.*, **247**:741-753.
- Birikh, K.R., Heaton, P.A., Eckstein, F. (1997a). The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur. J. Biochem.*, **245**:1-16.
- Birikh, K.R., Berlin, Y.A., Soreq, H., Eckstein, F. (1997b). Probing accessible sites for ribozymes on human acetylcholinesterase RNA. *RNA*, **3**:429-437.
- Boutorine, A.S., Venyaminova, A.G., Repkova, M.N., Sergueyeva, Z.A., Pyshtnyĭ, D.V. (1994). Effect of derivatization of ribophosphate backbone and terminal ribophosphate groups in oligoribonucleotides on their stability and interaction with eucaryotic cells. *Biochimie*, **76**:23-32.
- Chastel, C. (1996). Ces virus qui détruisent les hommes. L'histoire des virus des origines à nos jours. Éds Ramsey, Paris, 428 p.
- Chen, H., Ferbeyre G., Cedergren, R. (1997). Efficient hammerhead ribozyme and antisense RNA targeting in a slow ribosome *Escherichia Coli* mutant. *Nature Biotech.*, **15**:432-435.
- Careno, V., Bartolomé, J., Madejon, A. (1994). Hepatitis *delta* virus infection: molecular biology and treatment. *Dig. Dis.*, **12**:265-275.
- Campbell, T.B., Cech, T.R. (1995). Identification of ribozymes within a ribozyme library that efficiently cleave a long substrate RNA. *RNA*, **1**:598-609.

- Chowrira, B.M., Pavco, P.A., McSwiggen, J.A. (1994). *In vitro* and *in vivo* comparison of hammerhead, hairpin and hepatitis *delta* virus self-processing ribozyme cassettes. *J. Biol. Chem.*, **269**:25856-25864.
- Diener, T.O. (1993). Dans "Hepatitis *delta* virus: molecular biology, pathogenesis, and clinicals issues." (Hadziyannis, S.J., Taylor, J.M. et Bonino. Eds Wiley-Liss, NewYork.). p.109-116.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic sub-unit of the enzyme. *Cell*, **35**:849-857.
- Hadziyannis, S.D. (1997). Hepatitis *delta*. *J. Gastroenterology and Hepatology*, **12**:289-298.
- Herschlag, D. (1991). Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*: More isn't always better. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:6921-6925.
- James, H.A., Gibson, I. (1998). The therapeutic potential of ribozymes. *Blood*, **91**:371-382.
- Kawasaki H., Ohkawa, J., Tanishige, N., Yoshinari, K., Murata, T., Yokoyama, K.K., Taira, K. (1996). Selection of best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus EA1-associated 300 kDa protein (p300) and luciferase. *Nucleic Acids Res.*, **24**:3010-3016.
- Kijima, H., Ishida, H., Ohkawa, T., Kashani-Sabet, M., Scanlon, K.J. (1995). Therapeutic applications of ribozymes. *Pharmac. Ther.*, **68**:247-267.
- Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, J.F., Ohnuma, T. (1994). Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res.*, **54**:1271-1275.



- Kruger, K., Grawbowski, P.J., Zaug, A.J., Gottschling, D.E., Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, **31**:147-157.
- Lafontaine, D., Mercure, S., Perreault, J.-P. (1997). Update of the viroid and viroid-like sequence database: addition of the hepatitis *delta* RNA section. *Nucleic Acids Res.*, **25**:123-125.
- Lai, M.M.C. (1995). The molecular biology of hepatitis *delta* virus. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**:259-286.
- Lazinski, D.W., Taylor, J.M. (1994). Recent developpements in hepatitis *delta* virus research. *Adv. Virus Res.*, **43**:187-231.
- Lazinski, D.W., Taylor, J.M. (1995). Regulation of the hepatitis *delta* virus ribozymes: to cleave or not to cleave? *RNA*, **1**:225-233.
- Leavitt, M.C., Yu, M., Wong-Staal, F., Looney, D.J. (1996). *Ex vivo* transduction and expansion of CD4<sup>+</sup> lymphocytes from HIV+ donors: prelude to a ribozyme gene therapy trial. *Gene Ther.*, **3**:599-606.
- Macnaughton, T.B., Gowans E.J., McNamara, S.P., Burrell, C.J. (1991). Hepatitis *delta* antigen is necessary for access for hepatitis *delta* virus RNA to the cell machinery but is not part of transcriptional complex. *Virology*, **184**:387-390.
- Makino, S., Chang, M.F., Shieh, C.K., Kamahora, T., Vannier, D.M., Govindarajan, S., Lai, M.M.C. (1987). Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis *delta* virus RNA. *Nature*, **329**:343-346.
- Mercure, S., Lafontaine, D., Roy, G., Perreault, J.-P. (1997). Le motif autocatalytique d'ARN du virus *delta* de l'hépatite humaine. *Médecine/Sciences*, **13**:662-669.
- Ohkawa, J., Koguma, Y., Kohda, T., Taira, K. (1995). Ribozymes: from mechanistics to applications *in vivo*. *J. Biochem.*, **118**:251-258.

- Ohkawa, K., Yuki, N., Kanazawa, Y., Ueda, K., Mita, E., Sasaki, Y., Kasahara, A., Hayashi, N. (1997). Cleavage of viral RNA and inhibition of viral translation by hepatitis C virus RNA-specific *hammerhead* ribozyme *in vitro*. *J. Hepatology*, **27**:78-84.
- Perreault, J.-P., Altman, S. (1991). La ribonucléase P: une véritable enzyme à ARN *in vitro*. *Médecine/Sciences*, **7**:847-850.
- Perreault, J.-P., Labuda, D., Usman, N., Yang, J.H., Cedergren, R. (1991). Relationship between the 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis. *Biochemistry*, **30**:4020-4025.
- Perrotta A.T., Been, M.D. (1990). The self-cleaving domain from the genomic RNA of the hepatitis *delta* virus: sequence requirements and the effects of denaturant. *Nucleic Acids Res.*, **18**:6821-6827.
- Perrotta A.T., Been, M.D. (1996). Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage. *Nucleic Acids Res.*, **24**:1314-1321.
- Poisson, F., Roingeard, P., Goudreau, A. (1995) Le virus de l'hépatite *delta*: un mode de réplication bien singulier. *Médecine/Sciences*, **11**:1379-1387.
- Polson, A.G., Bass, B.L., Casey, J.L. (1996). RNA editing of hepatitis *delta* virus antigenome by dsRNA-adenosine desaminase. *Nature*, **380**:454-456.
- Rizzetto, M., Canese, M.G., Arico, J., Crivelli, O., Bonino, F., Trepo, C.G., Verne, G. (1977). Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (*delta/anti-delta*) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*, **18**:997-1003.
- Rossi, J.J. (1995). Controlled, targeted, intracellular expression of ribozymes: progress and problems. *Trends Biochem. Sci.*, **13**:301-306.

- Saenger, W. (1984). Principles of nucleic acid structure. Éds Springer-Verlag. New York. 556 p.
- Sioud, M. (1997). Effects of variations in length of hammerhead ribozyme antisens arms upon cleavage of longer substrates. *Nucleic Acids Res.*, **25**:333-338.
- Steitz, T.A., Steitz, J.A. (1993). A general two-metal ions mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6498-6502.
- Thaler, D.S., Liu, S., Tomblin, G. (1996). Extending of chemistry that supports genetic information transfer *in vivo*: Phosphorothioate DNA, phosphorothioate RNA, 2'-O-methyl RNA, and methylphosphonate DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:1352-1356.
- Wong-Staal, F., Poeschla, E., Looney, D., Yu, M., Leavitt, M., Yamada, O., Yee, J.-K. (1993). USA patent, submission #9309-057.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*, **244**:48-52.

## **6. ANNEXES**

**6.1 ARTICLE: Design of ribozymes to selectively cleave the human hepatitis *delta* virus mRNA**

Guylaine Roy, Sirinart Ananvoranich and Jean-Pierre Perreault

Département de biochimie  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Qué, Canada, J1H 5N4

June 4<sup>th</sup>, 1997

Article publié dans: *Nucleic Acids Symposium Series*, no 36, 93-95, 1997.

## Design of ribozymes to selectively cleave the human hepatitis *delta* virus mRNA

Guylaine Roy\*, Sirinart Ananvoranich and Jean-Pierre Perreault<sup>†</sup>

Département de Biochimie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

\*Presenting Author

<sup>†</sup>Corresponding Author

### ABSTRACT

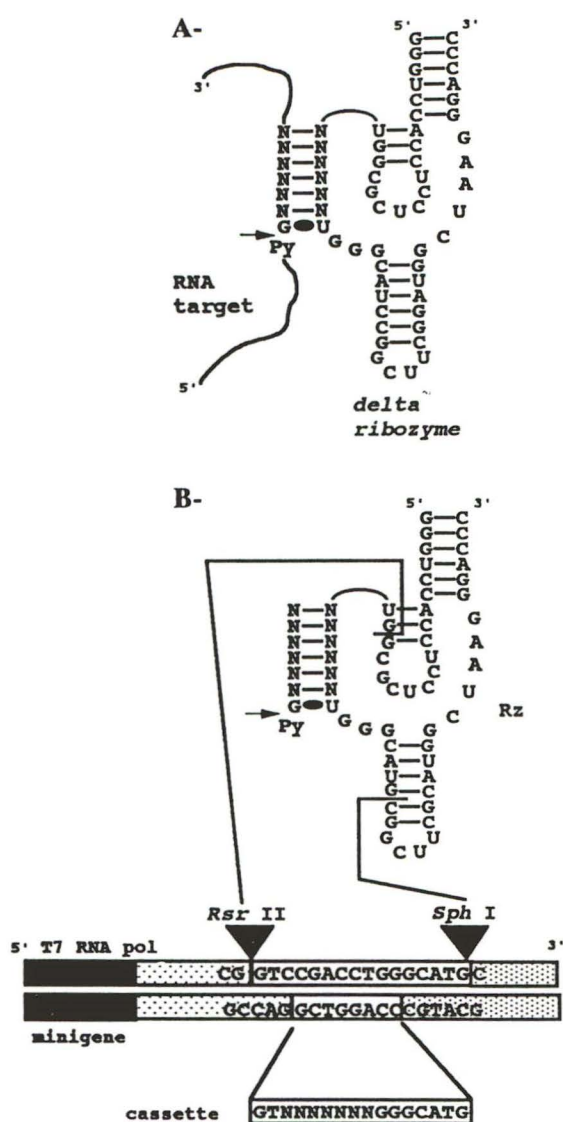
At least 15 million people worldwide are carriers of the human hepatitis *delta* virus (HDV). Thus, HDV infection could be an important public health problem. HDV contains two RNA catalytic domains known as *delta* motif derived from its genomic or antigenomic RNA. It has been proposed that these catalytic motifs are involved in the self-cleavage reaction of RNA multimeric copies produced during its rolling circle replication. Our goal is to develop a ribozyme-mediated gene inactivation system which selectively inhibits the HDV replication. For this purpose, the unique mRNA encoding HDV antigen (HDAg) is targeted. To identify the potential cleavage sites on the HDAg mRNA, we used various procedures to assess its secondary structure, namely computer-aided secondary structure prediction and RNase susceptibility assays. The accessibility of the target sites was further characterized by gel retardation and RNase H assays. Putative target sequences were then used in the construction of *delta* ribozymes. The cleavage activity of engineered *delta* ribozymes were assayed *in vitro* using various substrates. The most efficient ribozymes will be chosen for further studies *in vivo*.

### INTRODUCTION

HDV is a subviral particle that propagates only in the presence of hepatitis B virus (see 1, 2 and 3 for review). HDV is unique among animal viruses because it contains a single-stranded circular RNA genome of 1.7 kb, which codes for the two isoforms of *delta* antigen (HDAg). These proteins are crucial for the HDV life cycle, especially for its replication and its packaging. HDV shares several characteristics with plant viroids, which are small (246-463 nt), circular RNAs devoided of coding sequence that infect plants (4). Like viroids, HDV replicates through a

DNA-independent rolling circle mechanism. HDV contains both the genomic and the antigenomic self-cleaving motifs (*i.e.* ~85 nucleotides) involved in the release of monomers (3,5). It has been possible to separate the self-cleaving sequence in two molecules to develop a *trans* system where one molecule, identified as a *delta* ribozyme, possesses the catalytic properties required to catalyze successive cleavage of several molecules of substrate (*i.e.* turnover) (6).

We aim to develop a gene inactivation system which selectively inhibits the HDV replication by inactivation of the HDAg mRNA. This gene inactivation system is developed based on a specific cleavage activity of ribozymes. In principle, ribozymes recognize their substrates by base-pairing to form an enzyme-substrate complex and then cleave their substrates at a specific site. We chose the *delta* ribozyme for our studies because it is the only known ribozyme that naturally occurs in human cell and is active under physiological concentration of magnesium and calcium (3, 6). In addition, the *delta* ribozyme presents an advantage over other ribozymes due to the fact that it requires only a relatively short span of recognizable nucleotides on the substrate molecule to form an enzyme-substrate complex prior to cleavage (figure 1A). These sequences can be described as a stretch composed of a pyrimidine, a guanosine, and six other nucleotides (PyGN<sub>6</sub>) (7). Since the recognizable sequence is not long and restricted, one can theoretically design a *delta* ribozyme to cleave any substrates containing the span of PyGN<sub>6</sub>. However, one might encounter difficulties in defining accessible cleavage sites on the RNA substrate molecules. In the present report, we describe the identification and characterization of putative cleavage sites of *delta* ribozymes on the HDAg mRNA. Using the acquired data, we have



**Figure 1: Schematic representation of the d ribozyme and the minigene including a cassette for the modification of substrate recognition domain.** A) Sequence and secondary structure of the antigenomic d ribozyme that cleaves any target RNA. B) Minigene with a cassette for the modification of the substrate recognition domain. pUC19 vector had been engineered to have a unique Rsr II and Sph I restriction site flanking the recognition sequence. Solid arrow show the cleavage site; Py indicate a pyrimidine while N is for any nucleotide (G, U, C, A).

designed several *delta* ribozymes to bear recognition sites corresponding to the sequence of the HDag mRNA.

Reported sequences of HDV were retrieved

from our public data bank (8). In order to identify possible cleavage sites of a *delta* ribozyme on the HDAG mRNA, we aligned all the open reading frames (ORF) of the 17 known variants of HDV. Sequence analysis was performed on the aligned ORFs to define conserved areas containing the consensus sequence (PyGN<sub>6</sub>) of the *delta* ribozyme recognition domain. Preliminarily, 12 sites located throughout the ORFs were chosen. We then used various methods to evaluate the potential of these sites of being a target site for the cleavage reaction by a *delta* ribozyme. The potential of these putative cleavage sites were scored based on the hypothesis that the sites located on the double-stranded region are poor substrates because ribozyme would have to compete with intramolecular base-pairing to recognize these sequences. In addition, the accessibility of the sites and binding specificity was also used as criteria in the evaluation.

Computer generated secondary structures of each ORF were created using *mfold* version 2.3 (9). We found that eight possible sites were located mostly on the single-stranded region of the predicted structures. RNase susceptibility assays were performed to assess the single- and double stranded regions of the HDag mRNA. HDag mRNA was synthesized *in vitro* by T7 RNA polymerase, then 5' kinased in presence of [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP and purified following a polyacrylamide gel electrophoresis. The synthesized HDag mRNA was then subjected to RNase T1, V1 and U2 partial digestions. The data suggest that five chosen sites were mostly located on single-stranded regions. In order to assay for the accessibility of the proposed target sites, oligonucleotides having complementary sequences to the target sites of the HDag mRNA were synthesized and used in gel retardation analyses. Theoretically, the oligonucleotide which were able to hybridize the HDag mRNA (e.g. forming a DNA-RNA duplex) will be retarded in a native gel electrophoresis. Half of the oligonucleotides could form such RNA-DNA complexes. The binding specificity of these oligonucleotides to the mRNA were then assayed by RNase H digestion analysis. RNase H which specifically cleaves transcripts at the site formed a RNA:DNA duplex was added into each mixture containing the randomly labelled HDag mRNA and an individual oligonucleotides. The RNase H cleavage products were then resolved on a denaturing gel electrophoresis. Some of oligonucleotides exhibit a specific cleavage while others bind non-specifically.

Following analyses by computer-aided structure prediction, RNase susceptibility assays, gel retardation and RNase H assays, we further our investigation by choosing nine sites consisting of three sites giving positive results to all biochemical tests, five sites giving positive results to at least two tests, and one site giving negative results to all test. Nine oligonucleotides having sequences complementary to their corresponding sites of the HDVg mRNA were designed for the construction of modified *delta* ribozymes. The construction of *delta* ribozyme was carried out using a prepared pUC19 plasmid harboring antigenomic *delta* ribozyme currently used in our laboratory. In these constructions the substrate recognition domain of the ribozyme is flanked with the restriction sites of *Rsr* II and *Sph* I (figure 1B). The designed oligonucleotides were ligated to replace the region named as cassette of the *delta* ribozyme. The engineered *delta* ribozymes were prepared by *in vitro* transcription. Their cleavage activity was assayed using various synthetic substrates. Presently, we are investigating the cleavage activity of these engineered ribozymes *in vitro* to obtain their kinetic parameters. The engineered ribozymes with cleavage activity will be chosen for *in vivo* assays.

## CONCLUSION

The gene inactivation by ribozymes has important therapeutic implications because they could be designed to harbor a specific recognition sequence and specifically cleave target cellular or viral RNAs (10). Ribozymes could thus be used as a modulator of gene expression. Here we have shown the experimental approach to obtain a better design of a *delta* ribozyme directed to cleave a target molecule. Several studies have shown that the engineered ribozymes can inactivate target RNA like oncogenes (ras, c-fos, BCR-ABL) and viral RNA (in particular against HIV) (11). To our knowledge, no report to date shows the inhibition of HDV replication by using *delta* ribozyme.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Taylor for providing us the plasmid carrying the HDV sequence. This work was sponsored by a grant from Medical Research Council (MRC) of Canada. G.R and S.A are recipients respectively of predoctoral and postdoctoral fellowships from Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. J.-P. P. holds a scholarship from the MRC of Canada.

## REFERENCES

1. Lazinski, D.W. and Taylor, J.M. (1994) *Advances in Virus Research*, **43**, 187-231.
2. Lai, M.M.C. (1995) *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 259-286.
3. Mercure, S., Lafontaine, D., Roy, G. and Perreault, J.-P. (1997) *Médecine/Science*, **13**, 662-667.
4. Branch, A.D. Levine, B.J. and Robertson H.D (1990) *Semin Virol*, **1**, 143-152.
5. Lazinski, D.W and Taylor, J.M. (1995) *RNA*, **1**, 225-233.
6. Been, M.D. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 251-256.
7. Perrotta, A.T. and Been, M.D. (1992) *Biochemistry*, **31**, 16-21.
8. Lafontaine, D., Mercure, S. and Perreault, J.-P. (1996) *Nucleic Acids Res*, **25**, 123-125.
9. Zuker, M. (1989) *Science*, **244**, 48-52.
10. Altman, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 10898-10900.
11. Birikh, K.R., Heaton, P.A. and Eckstein, F. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **245**, 1-16.



## 6.2 ARTICLE DE SYNTHÈSE: **Le motif autocatalytique d'ARN du virus *delta* de l'hépatite humaine**

Stéphane Mercure, Daniel Lafontaine, Guylaine Roy et Jean-Pierre Perreault

Département de biochimie  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Qué, Canada, J1H 5N4

29 novembre, 1996

Article publié dans: *Médecine/Sciences*, no 5, vol 13, 662-669, 1997.

## Le motif autocatalytique d'ARN du virus delta de l'hépatite humaine

Stéphane Mercure  
Daniel Lafontaine  
Guylaine Roy  
Jean-Pierre Perreault

Le virus *delta* de l'hépatite humaine (VHD) est responsable de l'une des nombreuses formes d'hépatite virale. C'est un virus tout à fait particulier puisqu'il présente de nombreuses caractéristiques communes aux petits ARN pathogènes des plantes, telles qu'un mécanisme de réplication en cercle roulant indépendant de l'ADN, et un court génome constitué d'un ARN circulaire à forte structure secondaire. Le motif autocatalytique d'ARN retrouvé dans VHD, ou ribozyme *delta*, effectue le clivage en *cis* des brins multimériques produits lors de la réplication afin de libérer les monomères. Il peut également être manipulé de façon à effectuer le clivage en *trans* de certaines molécules d'ARN cibles. Cette dernière propriété pourrait s'avérer fort utile pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques ayant pour objectif l'inhibition de la réplication d'ARN viraux ou de la traduction d'ARNm cibles.

### ADRESSE

S. Mercure: stagiaire postdoctoral. D. Lafontaine. G. Roy: étudiants en thèse. J.P. Perreault : professeur adjoint, chercheur du Conseil de Recherches Médicales du Canada. Université de Sherbrooke, Département de biochimie, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.

### TIRÉS À PART

J.P. Perreault.

L'hépatite *delta* constitue l'une des nombreuses formes d'hépatite virale chez l'homme. La prévalence de ce type d'hépatite est particulièrement élevée sur les continents sud-américain, africain et asiatique [1]. Elle est, en revanche, quasi absente en Amérique du Nord et sur le continent européen où on ne la trouve que dans certains groupes à risque comme les toxicomanes par voie intraveineuse. L'agent causal de cette forme d'hépatite, transmis principalement par l'intermédiaire du sang, fut identifié comme un virus possédant un génome d'ARN circulaire simple brin dont la taille atteint 1,7 kilobase [2, 3]. Ce virus, nommé virus *delta* de l'hépatite humaine ou

VHD, n'est toutefois détecté que chez des individus également infectés par le virus de l'hépatite B (VHB). Seule la co-infection ou la surinfection de ces individus par le VHD peut être à l'origine de l'hépatite *delta* qui se caractérise par une sévérité accrue des dommages hépatiques par effet cumulatif de ces deux agents infectieux [1-3]. Une telle synergie résulte du fait que le virus *delta* de l'hépatite humaine nécessite, pour son encapsidation, l'apport en *trans* de protéines codées par le génome de VHB; le VHD est ainsi considéré comme un ARN satellite. Il se distingue également des autres virus actuellement connus au sein du règne animal par l'adoption d'une structure secondaire en forme de longue tige et une

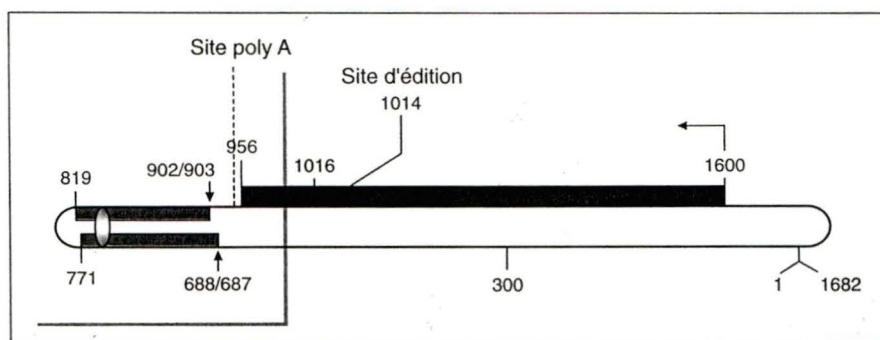


Figure 1. **Représentation schématique de la structure secondaire en tige du virus de l'hépatite  $\delta$  (VHD).** Le domaine terminal de gauche est encadré. Les boîtes rouges correspondent, respectivement, aux séquences autocatalytiques génomique (position 688 à 771) et antigénomique (positions 819 à 902); les flèches indiquent les sites de clivages résultants. La boîte noire représente le cadre de lecture pour les deux formes d'antigènes résultant ou non d'un événement d'édition (editing au sens de « correction sur épreuves ») à la position 1014. Le site de réticulation aux rayons ultraviolets est représenté par un ovale. La numérotation correspond à la séquence publiée par Makino et al. [7].

## RÉFÉRENCES

1. Lazinski DW, Taylor JM. Recent development in hepatitis delta virus research. *Adv Virus Res* 1994; 43: 187-231.
2. Poisson F, Roingeard P, Goudeau A. Le virus de l'hépatite delta: un mode de répllication bien singulier. *Med Sci* 1995; 10: 1379-87.
3. Lai MMC. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 259-86.
4. Branch AD, Levine BJ, Robertson HD. The brotherhood of circular RNA pathogens: viroids, circular satellites and the delta agent. *Semin Virol* 1990; 1: 143-52.
5. Symons RH. The small catalytic RNA. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 641-71.
6. Been MD. *Cis*- and *trans*-acting ribozymes from a human pathogen hepatitis delta virus. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 251-6.
7. Makino S, Chang MF, Shieh CK, Kama-hora T, Vannier DM, Govindarajan S, Lai MMC. Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta virus RNA. *Nature* 1987; 329: 343-6.
8. Polson AG, Bass BL, Casey JL. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature* 1996; 380: 454-6.
9. Lazinski DW, Taylor JM. Regulation of the hepatitis delta virus ribozymes: To cleave or not to cleave? *RNA* 1995; 1: 225-33.

m/s n° 5, vol. 13, mai 97

réplication indépendante de l'ADN qui s'effectue selon un mécanisme en cercle roulant [3]. Ces caractéristiques laissent présumer que le VHD s'apparente aux viroïdes ainsi qu'aux ARN satellites de virus de plantes, pathogènes causant d'importantes pertes économiques en monoculture [4]. Tout comme dans certains viroïdes, on retrouve au sein du génome de VHD de courts domaines d'ARN, de moins de 100 nucléotides, qui sont indispensables à la répllication de son ARN. Ces domaines sont caractérisés par leur capacité d'effectuer le clivage des intermédiaires de répllication du génome par un processus dit autocatalytique. Les domaines autocatalytiques identifiés chez les viroïdes et les ARN satellites de plantes se reconnaissent à leur structure en tête de marteau (*hammerhead*) ou en épingle à cheveux (*hairpin*) [5]. Chez VHD, ce domaine est connu sous le nom de ribozyme *delta* [6]. La présente synthèse se veut un complément à un article récemment paru dans *médecine/sciences*, qui présentait un résumé des connaissances concernant la biologie moléculaire de VHD [2]. Notre objectif consiste à résumer les connaissances concernant le ribozyme *delta*, son mécanisme moléculaire et ses applications potentielles, et à faire une analyse comparative des ribozymes les plus

fréquemment mentionnés pour leur capacité d'inhiber spécifiquement des ARN impliqués dans diverses affections.

## Arrangement et mode de fonction du ribozyme *delta* chez VHD

L'ARN génomique circulaire du VHD s'accumule dans les hépatocytes sous forme d'une longue structure en tige [3]. Cette structure résulte d'une complémentarité importante à l'intérieur du génome de VHD qui peut alors être séparé en deux domaines distincts (*figure 1*): le domaine de droite, qui est codant et le domaine terminal de gauche (~360 nucléotides), qui s'apparente fortement aux viroïdes (*figure 1*, portion encadrée de la séquence qui correspond aux nucléotides 620-980). Le domaine de droite comporte la majorité du cadre de lecture pour l'antigène *delta*, qui est traduit à partir de la séquence antigénomique. Cet antigène se présente sous deux formes, l'une de 195 acides aminés et l'autre de 214 acides aminés (*figure 1*) [2]. La forme allongée résulte d'un événement d'édition, qui a lieu à proximité du domaine terminal de gauche sur la copie génomique. De récents résultats démontrent qu'une désadénylation transforme le codon de terminaison du cadre de lecture



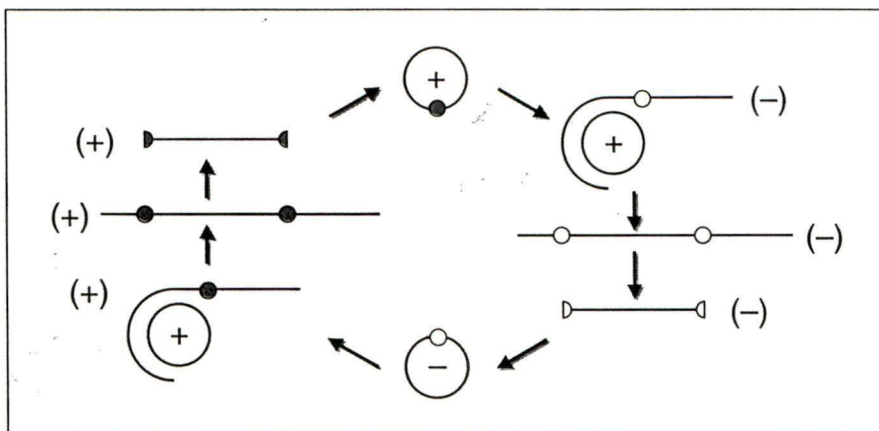


Figure 2. **Représentation du cycle de réplication en cercle roulant du VHD.** Les cercles rouges et blancs indiquent les sites d'autocoupure, respectivement des brins génomiques et antigénomiques. Les polarités génomique et antigénomique sont représentées respectivement par les symboles (+) et (-).

## RÉFÉRENCES

10. Sharmeen L, Kuo MYP, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. The antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol* 1988; 62: 2674-9.
11. Lazinski DW, Taylor JM. Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *J Virol* 1995; 69: 1190-200.
12. Sharmeen L, Kuo MYP, Taylor J. Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol* 1989; 63: 1428-30.
13. Smith JB, Gottlieb PA, Dinter-Gottlieb G. A sequence element necessary for self-cleavage of the antigenomic hepatitis delta RNA in 20M formamide. *Biochemistry* 1992; 31: 9629-35.
14. Branch AD, Robertson HD. Efficient *trans* cleavage and a common structural motif for the ribozymes of the human hepatitis delta agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10163-7.
15. Tanner NK, Schaf S, Thill G, Petit-Koskas E, Crain-Denoyelle AM, Westhof E. A three-dimensional model of hepatitis delta virus ribozyme based on biochemical and mutational analyses. *Curr Biol* 1994; 4: 488-98.
16. Been MD, Perrotta AT. Optimal self-cleavage activity of the hepatitis delta virus RNA is dependent on a homopurine base pair in the ribozyme core. *RNA* 1995; 1: 1061-70.

de la forme courte, en un codon tryptophane [8]. Le prochain codon de terminaison est alors reconnu comme signal d'arrêt de la traduction. La forme de 195 acides aminés est, entre autres, nécessaire pour permettre le début de la réplication tandis que la forme de 214 acides aminés favorise les étapes suivantes d'assemblage de la capside aux dépens de celles de réplication [3].

Le domaine terminal gauche porte, quant à lui, tous les éléments nécessaires à l'exécution de la réplication en cercle roulant. Le cycle de réplication du VHD est mis en route par la polymérase II de l'hôte, qui synthétise un brin multimérique antigénomique [2, 9]. Ce nouveau brin est coupé en copies monomériques qui sont liées pour produire des copies circulaires antigénomiques. Par la suite, ces dernières molécules d'ARN servent de matrices pour la production de la progéniture circulaire génomique, qui s'effectue selon les trois mêmes étapes de synthèse, clivage et ligation (figure 2). Le clivage des intermédiaires de réplication est accompli par deux domaines autocatalytiques distincts qui ont respectivement le rôle de couper les brins génomiques et antigénomiques. Les similitudes structurales observées entre le domaine terminal de gauche et les viroïdes sont à l'origine de la mise en évidence de l'activité autocatalytique chez VHD. En effet, l'identification d'une activité autocatalytique chez certains viroïdes conduisit à

rechercher un phénomène similaire chez VHD. L'analyse de fragments d'ARN d'origine génomique et antigénomique, à pH et température physiologiques en présence de l'ion magnésium, révéla la présence d'un site d'autocoupure spécifique sur chacun de ces brins [10]. Un fragment minimal conservant l'activité d'autocoupure fut par la suite identifié pour chacun des brins [6, 9]. Cette caractérisation révéla que la séquence minimale est, dans les deux cas, presque entièrement constituée de nucléotides situés du côté 3' par rapport au site de coupure (figure 3). Bien que la séquence primaire de ces domaines catalytiques soit relativement différente, les structures secondaires prédites s'avèrent presque identiques d'où l'appellation commune, « ribozyme delta », pour ces deux entités. Par suite de l'appariement partiel créant la structure en tige, les domaines autocatalytiques génomique et antigénomique se retrouvent directement opposés l'un à l'autre (figure 1). Les sites de clivage sont situés, respectivement, entre les nucléotides 687/688 et 902/903 pour les brins génomique et antigénomique (figure 1).

L'autoclivage consiste en une réaction de transestérification qui engendre des extrémités 2',3'-phosphocyclique et 5'-hydroxyle. Ces extrémités sont juxtaposées lors de la formation de la structure en tige des monomères circulaires. Les résultats de récentes expériences réalisées *in*

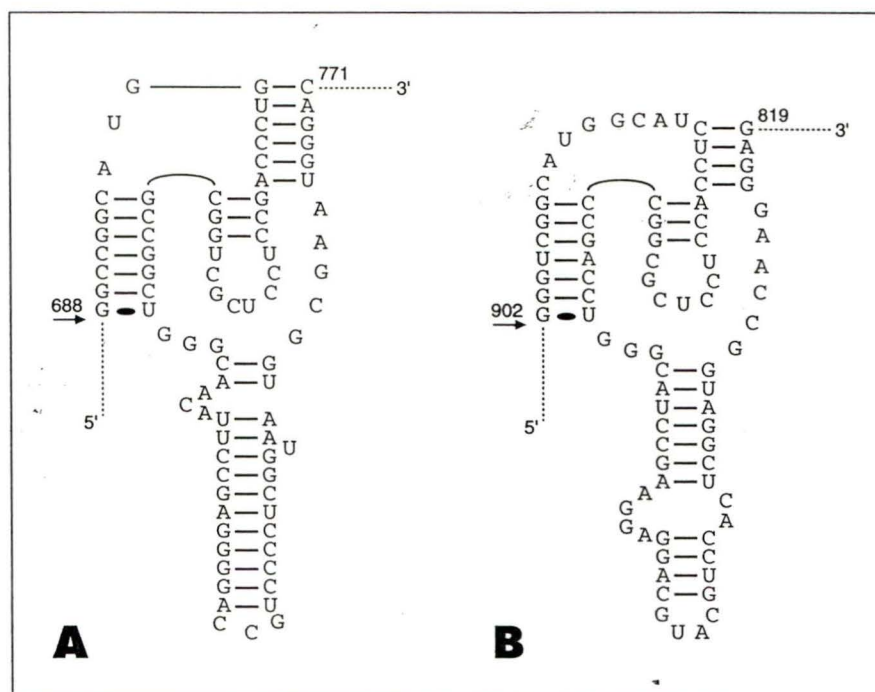


Figure 3. **Représentation schématique des motifs autocatalytiques d'ARN du VHD (réactions en cis).** Séquences nucléotidiques et structures secondaires des motifs autocatalytiques génomique (A) et antigénomique (B) selon le modèle de pseudo-nœud. Les sites de clivage sont identifiés par une flèche. La numérotation correspond à la séquence publiée par Makino et al. [7].

## RÉFÉRENCES

17. Suh YA, Kumar PKR, Kawakami J, Nishikawa F, Taira K, Nishikawa S. Systematic substitution of individual bases in two important single-stranded regions of the HDV ribozyme for evaluation of the role of specific bases. *FEBS Lett* 1993; 326: 158-62.
18. Kawakami J, Kumar PKR, Suh YA, Nishikawa F, Kawakami K, Taira K, Ohtsuka E, Nishikawa S. Identification of important bases in a single-stranded region (SSrC) of the hepatitis delta ( $\delta$ ) virus ribozyme. *Eur J Biochem* 1993; 217: 29-36.
19. Branch AD, Polaskova JA. 3-D models of the antigenomic ribozyme of the hepatitis delta agent with eight new contacts suggested by sequence analysis of 188 cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 4180-9.
20. Perrotta AT, Been MD. Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1314-21.
21. Bravo C, Lescure F, Laugâ P, Fourrey JL, Favre A. Folding of the HDV antigenomic ribozyme pseudoknot structure deduced from long-range photocrosslinks. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1351-9.
22. Kumar PKR, Taira K, Nishikawa S. Chemical probing studies of variants of the genomic hepatitis delta virus ribozyme by primer extension analysis. *Biochemistry* 1994; 33: 583-92.

*vivo* suggèrent que le mécanisme naturel de ligation des monomères est le fruit d'une catalyse impliquant une enzyme de l'hôte [11]. *In vitro*, il demeure cependant possible d'induire une ligation non enzymatique de ces extrémités, en l'absence de protéines [12]. De manière plus générale, il est proposé que des protéines accessoires (*helper*) pourraient être impliquées tant lors de la synthèse des brins que de l'autoclivage et de la ligation [9, 11].

L'adoption de la structure en tige par les monomères est également un élément important pour assurer la stabilité et l'intégrité du VHD. L'hybridation des séquences complémentaires aux dépens de la structure catalytique, moins stable en terme d'énergie libre [9], prévient l'autocoupure des copies filles ce qui diminue la susceptibilité potentielle de celles-ci à être dégradées par les ribonucléases intracellulaires. On a également étudié l'impact sur l'activité autocatalytique, d'appariements créant des structures secondaires alternatives adjacentes au ribozyme

*delta* [6, 9]. Ainsi, on démontra qu'une réduction de la longueur d'un fragment d'ARN portant le ribozyme *delta* pouvait s'accompagner d'une augmentation de l'activité de clivage et ce, jusqu'à obtenir une séquence minimale catalytiquement active. L'explication en est que l'on favorise graduellement la structure qui possède les propriétés catalytiques aux dépens de la structure en tige normalement plus stable. Ce phénomène explique également pourquoi l'autoclivage des fragments d'ARN relativement longs, dérivés des régions autocatalytiques du VHD, est stimulé par de fortes concentrations d'agents dénaturants tels l'urée et la formamide [13].

## Éléments essentiels du ribozyme *delta*

Lors de la réplication du VHD, le mécanisme de clivage des brins génomiques et antigénomiques est dit autocatalytique puisque la réaction a lieu *en cis* et une seule fois. Toutefois, il a été possible de diviser le brin



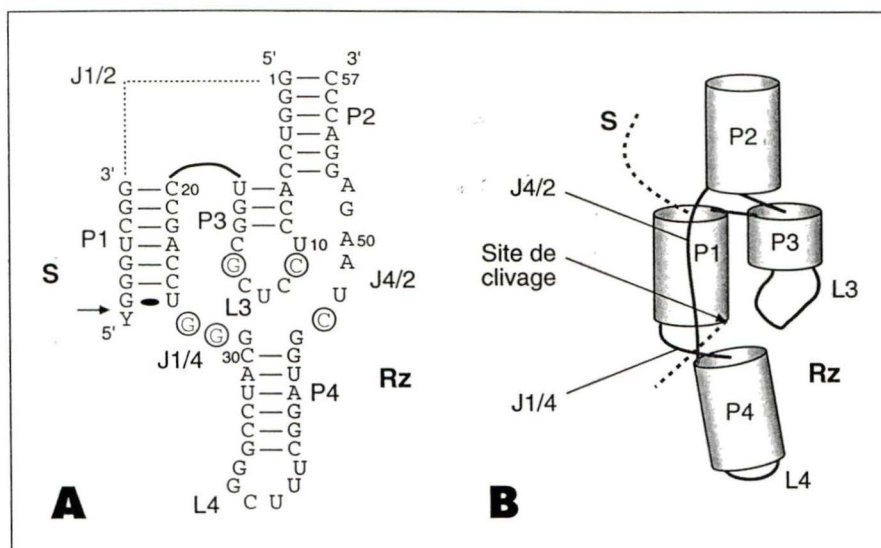


Figure 4. **Représentations schématiques de la structure secondaire et d'un modèle de structure tridimensionnelle du ribozyme delta.** **A.** Structure secondaire du complexe ribozyme-substrat (Rz-S) de la construction que nous utilisons couramment, dérivée de la séquence antigénomique. La flèche indique le site de coupure. Un Y identifie la pyrimidine adjacente au site de clivage. Les nucléotides identifiés comme ayant une influence sur l'efficacité de clivage du ribozyme sont encadrés. La ligne pointillée délimite la portion facultative qui peut être éliminée lors de la construction de ribozyme agissant en trans. **B.** Modèle de la structure tertiaire du complexe ribozyme-substrat. Les hélices sont illustrées par des barils tandis que les régions en simple brin le sont par un ruban en gras. Le ruban gras interrompu correspond au substrat.

## RÉFÉRENCES

23. Lee CB, Lai YC, Ping YH, Huang ZS, Lin JY, Wu HN. The importance of the helix 2 region for the cis-cleaving and trans-cleaving activities of hepatitis delta virus ribozymes. *Biochemistry* 1996; 35: 12303-12.
24. Altman S. RNA enzyme-directed gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10898-900.
25. Hélène C, Saison-Behmoaras E. La stratégie anti-sens: nouvelles approches thérapeutiques. *Med Sci* 1994; 10: 253-73.
26. Perreault JP, Altman S. La ribonucléase P: une véritable enzyme à ARN *in vitro*. *Med Sci* 1991; 7: 847-50.
27. Li Y, Altman S. Cleavage by RNase P of gene N mRNA reduces bacteriophage  $\lambda$  burst size. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 835-42.
28. Herschlag D. Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*: more isn't always better. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6921-5.
29. Ohkawa J, Koguma T, Kohda T, Taira K. Ribozymes: from mechanistic studies to applications *in vivo*. *J Biochem* 1995; 118: 251-8.
30. Chowrira BM, Pavco PA, McSwiggen JA. *In vitro* and *in vivo* comparison of hammerhead, hairpin, and hepatitis delta virus self-processing ribozyme cassettes. *J Biol Chem* 1994; 269: 25856-64.
31. Xing Z, Mahadevia S, Whitton JL. Antiviral activity of RNA molecules containing self-releasing ribozymes targeted to lymphocytic choriomeningitis virus. *Antisense Res Dev* 1995; 5: 203-12.
32. Polo JM, Lim B, Govindarajan S, Lai MMC. Replication of hepatitis delta virus RNA in mice after intramuscular injection of plasmid DNA. *J Virol* 1995; 69: 5203-7.

d'ARN en deux domaines et de développer une réaction en *trans* dans laquelle une molécule, identifiée comme un ribozyme, possède les propriétés catalytiques nécessaires au clivage successif de plusieurs molécules de substrats (figure 4A) [6, 14]. La spécificité et l'association du complexe ribozyme-substrat sont assurées par la formation d'une hélice double brin entre ces deux entités. La subdivision des domaines ribozyme et substrat s'effectue en séparant le fragment initial d'ARN à plusieurs endroits tout en respectant la structure secondaire catalytique minimale. La façon usuelle de séparer le ribozyme du substrat consiste à scinder le brin d'ARN à l'extrémité 3' de l'hélice où se produit le clivage (figure 4A). Pour des raisons encore inconnues, la catalyse par le brin génomique du ribozyme *delta* est moins efficace que par celle du brin antigénomique [5, 8]. Par conséquent, ce dernier est généralement utilisé comme ribozyme. Le développement de système en *trans* a permis d'importants progrès dans la compréhension du mécanisme molé-

culaire de cette catalyse. Ainsi, de nombreux essais de corrélation entre structure et fonction à l'aide d'ARN produits par transcription *in vitro*, à partir de matrices d'ADN modifiées par mutagenèse dirigée, ont permis de décrire la structure secondaire catalytique ainsi que d'identifier certains éléments essentiels au clivage. Nous nous contenterons ci-dessous de dresser un portrait des connaissances actuelles concernant le ribozyme *delta*.

La structure secondaire du ribozyme *delta* se résume à quatre hélices identifiées de P1 à P4, deux boucles internes, L3 et L4, et trois jonctions simples brin nommées J1/2, J1/4 et J4/2 selon les hélices qu'elles réunissent (figure 4A). Une brève description de l'importance de chacun de ces éléments pour la catalyse est présenté ci-dessous (voir aussi [6, 15]).

- **Nature et composition des hélices.** L'hélice P1 lie le ribozyme au substrat. Elle est constituée de 7 paires de bases (pb)  $\pm$  1. Cette hélice est adjacente au site de clivage. Sa com-

position en nucléotides a peu d'impact sur l'efficacité de la catalyse. Néanmoins, plus elle est riche en résidus G et C, plus la liaison ribozyme-substrat est efficace. L'hélice P3 est composée de seulement 3 pb. La longueur de P3 est cruciale, suggérant qu'elle positionne la boucle L3 par rapport au site de clivage. La nature des nucléotides composant P3 n'est pas primordiale pour l'efficacité de la catalyse, mais il y a une nette préférence pour les paires de bases GC. Comme l'hélice est très courte, la stabilité conférée par les paires de bases GC pourrait être requise pour sa formation. L'hélice P4 est un élément structural contribuant au bon assemblage et à la stabilité du corps catalytique. Cependant, l'hélice P4 ainsi que la boucle L4 peuvent être enlevées et remplacées par une courte séquence d'espacement de 3 nucléotides sans effet négatif majeur sur l'efficacité de la réaction. L'épingle à cheveux formée par l'hélice P4 et la boucle L4 est d'ailleurs caractérisée par un grand nombre de variants naturels de séquence. Finalement, l'hélice P4 est invariablement précédée d'une paire de bases non traditionnelle GG nécessaire pour une catalyse efficace [16]. Lors de sa formation, un tel appariement non Watson-Crick induit une distortion dont l'impact sur la structure tertiaire et le mécanisme moléculaire du ribozyme *delta* demeure inconnu. Pour sa part, l'hélice P2 est le résultat d'une complémentarité entre des bases de la jonction J1/2 et d'autres bases situées en aval de l'hélice P4 (figure 4A). Un tel appariement, connu sous le nom de pseudo-nœud, est essentiel à la structure secondaire de ce ribozyme puisqu'il permet de positionner la jonction J4/2 au sein de la structure tertiaire. La composition en nucléotides de cette hélice n'a cependant que peu d'effet sur le niveau de clivage.

• **Les régions en simple brin.** Certaines de ces régions sont accessoires tandis que d'autres comptent des nucléotides essentiels à la catalyse. Au niveau du substrat une pyrimidine doit être adjacente en 5' au site de clivage (figure 4A). La boucle L4 et la jonction J1/2 sont des éléments accessoires associés à la réaction

autocatalytique. Généralement, elles sont absentes des modèles d'études en *trans*. Les trois autres régions en simple brin, L3, J1/4 et J4/2 sont importantes. Des expériences de sélection *in vitro* d'ARN présentant une caractéristique spécifique à partir d'un répertoire de séquences aléatoires (SELEX) (dans ce cas pour une efficacité élevée d'autocoupe) ainsi que des études par mutagenèse dirigée ont révélé l'identité des nucléotides essentiels à la catalyse à l'intérieur de ces régions [9, 15, 17-20]. La boucle L3 comporte 7 ou 8 nucléotides dont le C<sub>11</sub> et le G<sub>15</sub> qui sont essentiels à l'activité catalytique. Au niveau de la jonction J4/2, le C<sub>47</sub> est crucial pour que le mécanisme de clivage s'effectue. Finalement, la jonction J1/4 comporte deux G (positions 27 et 28) importants pour l'activité catalytique (figure 4A); cependant, leurs rôles demeurent inconnus.

#### Modélisation de la structure tridimensionnelle

Au cours des dernières années, de nombreux efforts ont été faits pour résoudre l'énigme que constitue la structure tridimensionnelle du ribozyme *delta*, cruciale si l'on veut comprendre cette macromolécule. Des études d'interférences chimiques et de réticulation aux rayons ultraviolets (avec des agents photoactivables situés à différentes positions du substrat; [21]) ainsi que la modélisation assistée par ordinateur, ont permis d'obtenir des données préliminaires sur la structure tertiaire de ce ribozyme [15, 19, 22]. La figure 4B illustre un modèle simplifié du complexe ribozyme-substrat dans lequel les hélices sont représentées par des barils. Brièvement, les hélices P1 et P3 sont parallèles et, avec la boucle L3, délimitent le centre catalytique du ribozyme, qui se trouve stabilisé par les hélices P2 et P4 localisées de part et d'autre de la structure. La partie du substrat impliquée dans l'hélice P1 se retrouve à l'intérieur du centre catalytique, ce qui permet l'action au site de clivage (voir la flèche, figure 4B). Une telle localisation pourrait aussi expliquer pourquoi le relargage du produit peut, dans certains cas, être limitant [23]. Par ailleurs, les nucléotides des

régions en simple brin mentionnés comme essentiels à la catalyse se retrouvent tous dans le même environnement; soit les G<sub>27</sub> et G<sub>28</sub> de la jonction J1/4, le C<sub>47</sub> de la jonction J4/2 et le C<sub>11</sub> ainsi que le G<sub>15</sub> de la boucle L3. Une étude d'interférences chimiques apporte un soutien de plus à ce modèle puisqu'elle a permis de démontrer que, sauf exception du C<sub>47</sub>, tous ces nucléotides sont protégés en présence de magnésium [22]. Le ribozyme *delta* est une métalloenzyme à ARN qui utilise comme cofacteur le calcium aussi efficacement que le magnésium [6]. Cette propriété lui est propre et le différencie de tous les autres ARN catalytiques connus. Cependant, tout comme l'enzymologie de cette catalyse, le pourquoi et les conséquences découlant de cette propriété demeurent inconnus. En effet, les paramètres cinétiques du clivage accompli par le ribozyme *delta* demeurent encore à ce jour largement méconnus, que le cofacteur utilisé soit le magnésium ou le calcium. Les travaux actuels de nombreuses équipes intéressées à mieux comprendre le mécanisme moléculaire du ribozyme *delta* par biochimie, résonance magnétique ou cristallographie, contribueront à mieux visualiser et à comprendre ce ribozyme unique en son genre.

#### Recherche et développement de l'application du ribozyme *delta*

Les ribozymes peuvent être considérés comme des agents thérapeutiques prometteurs pour moduler des ARN donnés dans le contexte cellulaire (figure 5) [24]. Par exemple, ils pourraient cibler puis cliver des ARN viraux de façon à prévenir la réplication ultérieure de ces pathogènes, ou encore moduler le produit de l'expression de gènes tels les oncogènes impliqués dans différents cancers humains. Par comparaison avec la technologie des ARN antisens [25], les ribozymes offrent trois avantages [24]: (1) ils modifient les ARN cibles et ne se limitent pas à inhiber ou à ralentir la maturation ou la traduction d'un ARN messager; (2) ils adoptent une structure tertiaire très organisée, ce qui leur confère une stabilité accrue en milieu cellulaire; et (3) ils possèdent, lorsque le relargage des produits est nonlimitant, une activité



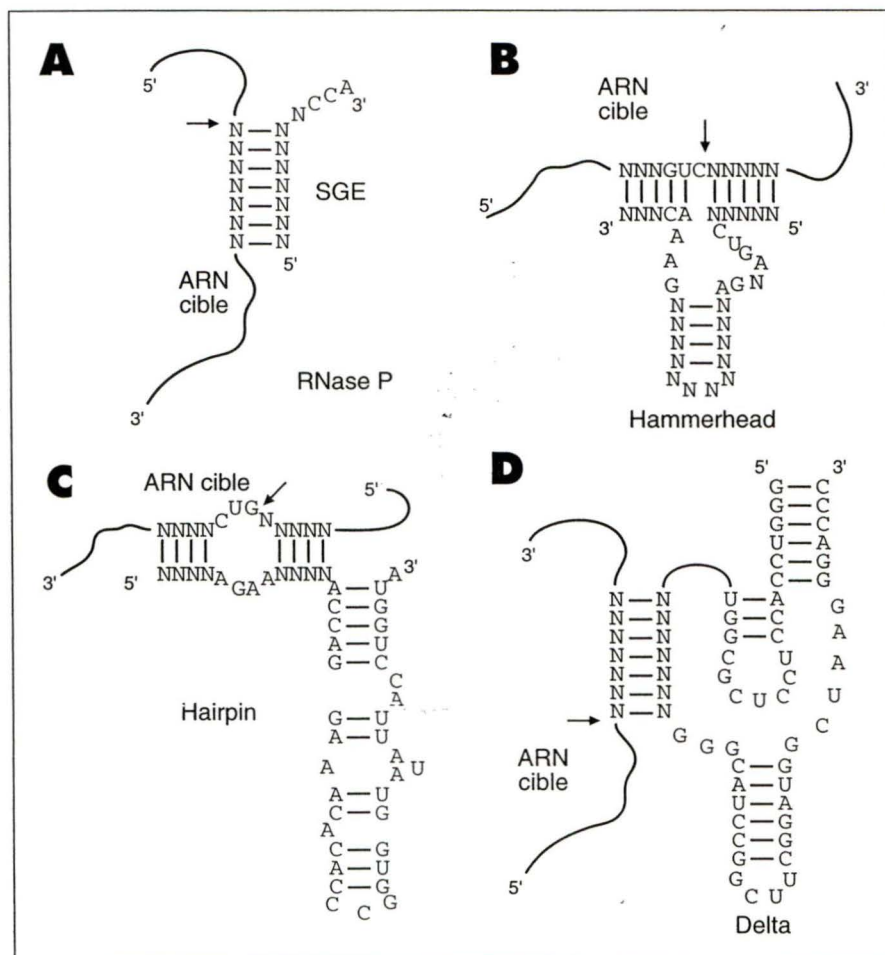


Figure 5. **Représentation schématique de différents ribozymes ciblant des substrats d'ARN non naturels.** A. La RNase P et sa séquence guide externe (SGE); B. le ribozyme hammerhead (en tête de marteau); C. Le ribozyme hairpin (en épingle à cheveux); et D. Le ribozyme delta. Les ARN cibles sont représentés par une ligne dont seulement les nucléotides impliqués dans la reconnaissance ribozyme-substrat sont identifiés. Seule l'identité des nucléotides absolument requis est présentée. N représente un nucléotide quelconque (A, G, C ou U) ayant la capacité de former ou non une paire de base Watson-Crick. Les sites de clivage sont pointés par des flèches. À l'exception du ribozyme delta, les trois autres modèles comportent uniquement les nucléotides extrêmement conservés. Concernant le ribozyme delta, un appariement instable G-U à l'extrémité 5' de l'hélice P1 pourrait s'avérer nécessaire à la catalyse. En raison de l'incertitude qui entoure la présence de cet appariement, celui-ci a été volontairement omis.

moléculaire spécifique (*turnover*) leur permettant de modifier successivement plusieurs molécules de substrats, ce qui est, sans aucun doute, leur avantage le plus important.

Les ribozymes peuvent être appliqués selon deux modes [24]. D'une part, ils peuvent être synthétisés par voie chimique ou enzymatique et être intégrés à différents véhicules de façon à être livrés de manière exogène à des cellules cibles. Ce mode permet d'introduire des nucléotides

analogues pour augmenter la stabilité (ex.: désoxyribonucléotides, etc.) des molécules contre les nucléases cellulaires. D'autre part, les ribozymes peuvent être synthétisés de manière endogène par l'utilisation de vecteurs d'expression, ce qui assure une production continue de l'agent thérapeutique dans la cellule cible.

Bien que tous les ribozymes possèdent *a priori* un potentiel important pour inactiver des ARN cibles, jusqu'à ce jour, seules les séquences

catalytiques *delta*, *hammerhead* (en tête de marteau), *hairpin* (en épingle à cheveux) et la ribonucléase P (RNase P) ont fait l'objet d'essais préliminaires *in vivo*. La RNase P est une enzyme vitale qui catalyse le clivage endonucléotidique à l'extrémité 5' des ARN de transfert [26]. Cette enzyme est composée d'une sous-unité ARN et d'au moins une sous-unité protéique. Chez les eubactéries, telle *Escherichia coli*, la sous-unité ARN possède les propriétés catalytiques et est le seul vrai ribozyme naturel décrit à ce jour (c'est-à-dire capable de catalyser une réaction *in trans*). L'observation qu'une seule RNase P était responsable de la maturation de tous les précurseurs d'ARN de transfert d'une cellule suggérait que cette enzyme ne reconnaissait pas une séquence mais plutôt une structure. Cette dernière fut identifiée et consiste en une hélice flanquée d'une séquence précurseur en 5' et d'une séquence NCCA en 3' (figure 5A). La séquence possédant le NCCA constitue une séquence guide externe, qui peut cibler successivement plusieurs molécules de substrat [26]. Pour une application potentielle, ce ribozyme devrait cibler n'importe quelle séquence d'ARN, pour autant que celle-ci soit accessible et que la séquence guide externe désirée soit fournie. Comme la RNase P est un constituant naturel des cellules procaryotes et eucaryotes, son utilisation pour le développement d'une thérapie anti-ARN reçoit beaucoup d'attention [27].

Trois autres ribozymes isolés de différentes sources offrent des possibilités thérapeutiques intéressantes. Le ribozyme *hammerhead* (figure 5B) retrouvé chez des viroïdes et des ARN apparentés, le ribozyme *hairpin* (figure 5C) retrouvé uniquement chez des ARN satellites de virus de plantes [4] et le ribozyme *delta* retrouvé chez le virus humain de l'hépatite *delta*. Le principe d'utilisation de ces ribozymes est fondé sur l'observation que leur domaine structural, qui est responsable de l'activité d'autoclivage, est séparable en deux entités pouvant être chacune représentée par un oligonucléotide [24]. Ainsi, un premier oligonucléotide peut posséder les propriétés catalytiques, tandis que le second correspondra au substrat et présentera le site potentiel de clivage



(figure 5B-D). Ces deux oligonucléotides doivent s'associer par l'intermédiaire d'une (*delta*) ou deux hélices (*hammerhead*, *hairpin*) pour que le clivage soit réalisé. La séquence du substrat étant connue (ARN cible), la séquence complémentaire permettant l'hybridation du ribozyme définit la reconnaissance. Il y a un minimum de contraintes à respecter, telle que la séquence GUC adjacente au site de coupure d'un substrat pour le ribozyme *hammerhead* (figure 5B). Parmi ces trois modèles, le ribozyme *delta* est le moins contraignant puisqu'il ne nécessite, au niveau du substrat, qu'une pyrimidine adjacente au site de clivage (figure 5D). Le court domaine de reconnaissance de 7 +/- 1 pb de l'hélice P1 du ribozyme *delta* peut être considéré comme une limite d'utilisation, car moins discriminatif comparé aux deux hélices des ribozymes *hammerhead* et *hairpin* (généralement composées de ~ 5 +/- 1 pb chacune). Une analyse théorique tenant compte du pouvoir de discrimination de la cible, de l'efficacité de l'appariement et de la vitesse de relargage des produits de clivage a permis d'établir que 7 pb est la longueur optimale pour une séquence antisens [28]. Les séquences plus courtes limitent le pouvoir de discrimination et sont moins efficaces pour la formation du complexe ribozyme-substrat, tandis que les séquences plus longues peuvent limiter l'étape de libération des produits entraînant une diminution non souhaitable de l'activité moléculaire spécifique des ribozymes. De plus, de longues séquences de reconnaissance peuvent réduire le pouvoir de discrimination en permettant des appariements partiels avec d'autres séquences que la cible, ce qui peut entraîner le clivage d'ARN non ciblés et/ou la réduction de la quantité de ribozyme actif car une portion est engagée dans un complexe ribozyme-substrat non productif.

Les ribozymes *hammerhead* et *hairpin* offrent les avantages d'être courts et de présenter des mécanismes moléculaires relativement bien établis [5]. Ce sont ces ribozymes qui ont reçu le plus d'attention pour le développement de thérapies anti-ARN. Par exemple, ils ont été utilisés *in vivo* pour cibler le génome du VIH ainsi que plusieurs transcrits qui en sont

dérivés [24, 29]. Malgré notre compréhension toujours imparfaite de son mécanisme moléculaire, le ribozyme *delta* se compare avantageusement aux ribozymes précédents. En effet, ce ribozyme possède des caractéristiques qui lui sont propres et qui pourraient s'avérer d'importance lors du développement de traitements par des ARN catalytiques: (1) le ribozyme *delta* présente la capacité naturelle d'être fonctionnel dans un contexte de protéines nucléaires humaines; (2) sa région de reconnaissance de la séquence cible impose un minimum de restriction et est optimale en terme de longueur (voir ci-dessus); (3) il utilise aussi efficacement le calcium que le magnésium comme co-facteur; et, (4) il est fonctionnel à la concentration de magnésium libre intracellulaire (1mM). Jusqu'à maintenant l'application du ribozyme *delta* a été relativement limitée [30, 31]. Par exemple, la transfection transitoire de cellule de souris, par un vecteur plasmidique portant la séquence du ribozyme *delta*, a permis de démontrer la capacité de ce ribozyme de produire l'autoclivage dans un milieu cellulaire hétérologue [30]. L'intérêt médical associé au VHD ne se limite cependant pas à son potentiel anti-ARN. Le VHD offre pour alternative intéressante son utilisation comme vecteur d'expression après élimination des séquences de pathogénicité. Le VHD pourrait ainsi être appelé à transporter et relarguer dans les hépatocytes des ribozymes qui, par leur spécificité, auraient le potentiel d'inhiber la réplication de VHD ou VHB lors d'infections chroniques [1]. Le potentiel de VHD comme vecteur d'expression est, d'ailleurs, beaucoup plus important qu'on ne l'a cru au premier abord, puisque plusieurs types de cellules non hépatiques permettent sa réplication [32].

La découverte surprenante des ARN catalytiques constitue une démonstration classique du lien qui existe entre la recherche et le développement. Bien que le potentiel thérapeutique des ribozymes demeure à ce jour inexploité, différents travaux suggèrent que ces ARN catalytiques pourraient constituer des outils cliniques dans un futur plus ou moins rapproché. Il est encore trop tôt pour affirmer lequel des ribozymes présentés ci-dessus, ou encore un ribozyme toujours

inconnu, parviendra à franchir les différentes étapes menant à sa validation et à son approbation comme agent thérapeutique. Toutefois, les caractéristiques particulières du VHD font de ce dernier un candidat de choix puisqu'il peut s'avérer aussi utile comme vecteur que comme agent anti-ARN. De façon à exploiter pleinement le potentiel du VHD et des autres ARN autocatalytiques, une collaboration étroite devra être établie entre les équipes de recherche et de développement pour parfaire nos connaissances concernant le mécanisme moléculaire des ribozymes ainsi que leur mode de transfert et d'expression *in vivo* ■

#### Remerciements

Nos travaux de recherche sont subventionnés par le Conseil de Recherches Médicales (CRM, Canada), le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG, Canada) et le Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Fonds FCAR, Québec). G.R. et D.L. ont des bourses prédoctorales respectivement du CRSNG et du FRSQ-FCAR. J.P.P. est un chercheur boursier du CRM.

#### Summary

##### The self-catalytic RNA motifs of the hepatitis delta virus

The hepatitis delta virus (HDV) is responsible for a common form of viral hepatitis. This virus is unique among human pathogens and shares several characteristics with plant viroids, such as their DNA-independent rolling circle replication mechanism and a highly folded small circular RNA genome. The present review will focus on the structures, the molecular mechanism and the applications of the *delta* ribozyme which is the self-catalytic motif found in HDV. This motif performs the *cis* cleavage of the multimeric strands in monomers during HDV replication. The *delta* ribozyme may also be modified so cleavage of a target RNA is achieved in *trans*. This last property might be helpful in the development of therapeutic applications aimed at inhibiting replication of viral RNA or translation of target mRNA.

### 6.3 LETTRES D'APPROBATION DES CO-AUTEURS